

Syddansk Universitet

Udvikling af forsknings- og erhvervsstrategi for ginseng i Danmark

Slutrapport

Jensen, Martin; Christensen, Lars Porskjær ; Kristiansen, Karsten; Bidstrup, T; Brøsen, Kim; Kobæk-Larsen, Morten; Møldrup, Palle; Nøddekær, Jannick; Jepsen, Marianne

Publication date:
2006

Document version
Også kaldet Forlagets PDF

Citation for pulished version (APA):
Jensen, M., Christensen, L. P., Kristiansen, K., Bidstrup, T., Brøsen, K., Kobæk-Larsen, M., ... Jepsen, M. (2006). Udvikling af forsknings- og erhvervsstrategi for ginseng i Danmark: Slutrapport. Årlev: Danmarks JordbrugsForskning ; Udviklingscenter Årlev.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Udvikling af forsknings- og erhvervsstrategi for ginseng i Danmark.



Slutrapport

Jensen, M., Christensen, L.P., Kristiansen, K., Bidstrup, T., Brøsen, K., Kobæk-Larsen, M., Møldrup, P., Nøddekær, J., Jepsen, M.

Danmarks JordbrugsForskning, Afdeling for havebrugsproduktion, Forskningscenter Årlev.
Udviklingscenter Årlev, Forsknings Center Årlev.

Indholdsoversigt

Indledning	3
Delprojekt:	
1. Etablering af nationalt tværfagligt ginseng netværk	7
2. Afholdelse af tværfaglig workshop/seminar	15
3. Studietur til europæiske ginseng producenter/europæiske ginseng aktiviteter.....	17
4. Review af klinisk dokumentation på ginseng.....	20
Review of recent reported clinical effects of ginseng	21
Review of the health promoting effects of ginseng in preclinical studies	44
5. Aktiv-og indholdstoffer- synteseveje i ginseng	57
6. Analyse af aktivstoffer i ginseng bær.....	71
7. Indledende bioassay af bærprodukter - diabetes	80
8. Anti-diabetisk effekt af isolerede enkelt ginsenosider	82
9. Dyrknings-, høst- og ekstraktionsmetoder for bær og frø	117
10. Identifikation og selektion af største rødder med højeste koncentration af indholdsstoffer.....	134
11. Dyrkningsforsøg- metoder til at eliminere manuel ukrudtsbekæmpelse	141
12. Sammenlignende dyrkningsforsøg med amerikansk og koreansk ginseng	144
13. Indledende forsøg med potteplanter af ginseng	148
15. Identifikation af dansk process- og forarbejdningsudstyr til ginseng	158
Konklusion og strategioplæg.....	196
Liste over publikationer fra projektet	201
Liste over projektdeltagere	204

Litteraturhenvisninger og evt. bilag er anført i umiddelbar tilknytning til hvert delprojekt.

Indledning

Baggrund

Der er igennem de senere år genereret meget viden om ginseng som plantemedicin i Danmark. Dette gælder både i relation til produktion, indholdsstoffer, forarbejdning, kliniske afprøvninger, produktudformning, afsætning og forskningsmetoder. Denne viden er dog spredt ud over mange brancher, institutioner og firmaer, hvilket betyder at synergieffekter og effekt af kritisk masse på udviklingshastigheden på området ikke er udnyttet. Der er derfor behov for en proces, som samler denne viden og kompetence i et 'fælles viden rum' for ginseng, som via et optimeret overblik over nuværende kompetencer og strategiske udviklingsfelter giver mulighed for en målrettet analyse af fremtidige muligheder på ginseng i Danmark. En målrettet forsknings-, udviklings- og erhvervsstrategi for ginseng er målet. Gennemførelse af en række målrettede indledende delundersøgelser på udvalgte områder med særlig stort potentiale, vil kunne sikre et endnu bedre grundlag for vurdering og målrette den fremtidige udnyttelse af ginseng.

Formål

Det overordnede formål med nærværende projekt har været at samle, integrere og udbygge den eksisterende viden og kompetence på ginseng i Danmark med henblik på at udarbejde strategier for fremtidig forskning og kompetenceudvikling og sikre en bæredygtig dansk erhvervsudvikling.

Projektets mål var på baggrund af en begrænset tidsmæssig og økonomisk indsats at sikre et bredt overblik over muligheder, som efterfølgende kan give baggrund for mere fokuserede og dybdegående projekter på udvalgte områder.

Indsatsen på en række af delområderne skal ses som et led i en 'koncept udvikling' af undersøgelsesmetoder og screeningsprocedurer, der vil kunne udnyttes effektivt i et fremtidigt samarbejde indenfor TCM (Traditional chinese medicines center) på andre medicinal planter. Projektet har derfor både styrket mulighederne i dansk dyrkning, forarbejdning og salg, men samtidig øge den strategiske danske kompetence til internationalt samarbejde på plantemedicin området.

Projektet var opdelt i 15 delmål, med varierende indsats både økonomisk og fra forskning til praktisk erfaringsopsamling, netværksdannelse og litteraturstudier.

Delmål

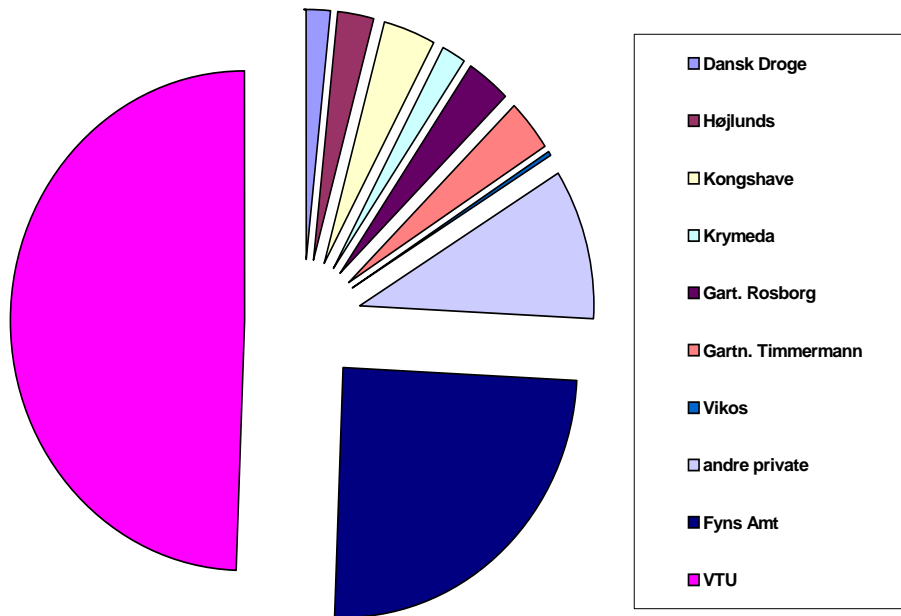
1. Etablering af nationalt tværfaglig ginseng netværk
2. Afholdelse af tværfaglig workshop/seminar
3. Studietur til europæiske ginseng producenter
4. Review af klinisk dokumentation på ginseng
5. Aktiv-og indholdstoffer- synteseveje i ginseng
6. Analyse af aktivstoffer i ginseng bær
7. Indledende bioassay af bærprodukter - diabetes
8. Effekt af isolerede enkelt ginsenosider
9. Dyrknings-, høst- og ekstraktionsmetoder bær og frø
10. Identifikation og selektion af største rødder med højeste koncentration af indholdsstoffer
11. Dyrkningsforsøg- metoder til at eliminere manuel ukrudtsbekæmpelse
12. Sammenlignende dyrkningsforsøg med amerikansk og koreansk ginseng
13. Indledende forsøg med potteplanter af ginseng
14. Etablering af genbank af ginseng arter
15. Identifikation af dansk process- og forarbejdningsudstyr til ginseng

Udover de specifikke resultater fra hvert af delprojekterne, har det været målet at udarbejde et samlet forslag til strategiske udviklingsmuligheder for ginseng i Danmark.

Finansiering og budgetanvendelse blev kun ændret marginalt i forhold til det oprindeligt budgetterede, og nedenfor viste fordelinger er derfor udarbejdet på baggrund af de oprindelige projektdata.

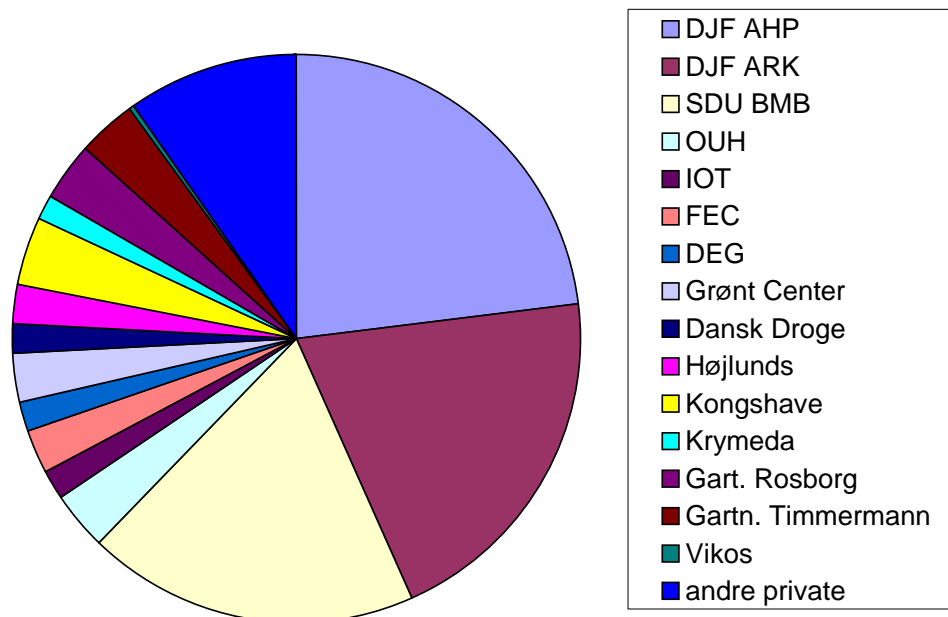
Projektets budget var 1,2 mill. kr., som blev finansieret fra Ministeriet for Videnskab, Teknologi og Udvikling, Fyns Amt, og medfinansieret af en række private firmaer. I figur 1 ses den oprindelige fordeling af finansieringsgrundlaget på parterne.

Finansieringskilder

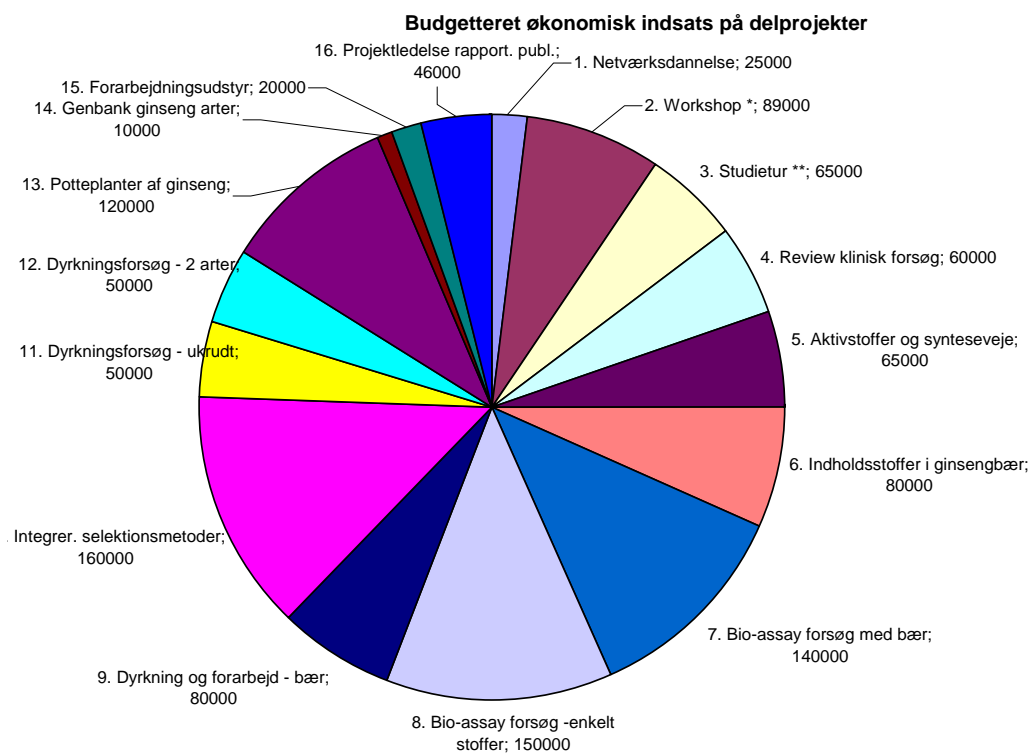


Figur 1. Oversigt over fordelingen af finansieringsgrundlaget på parterne.

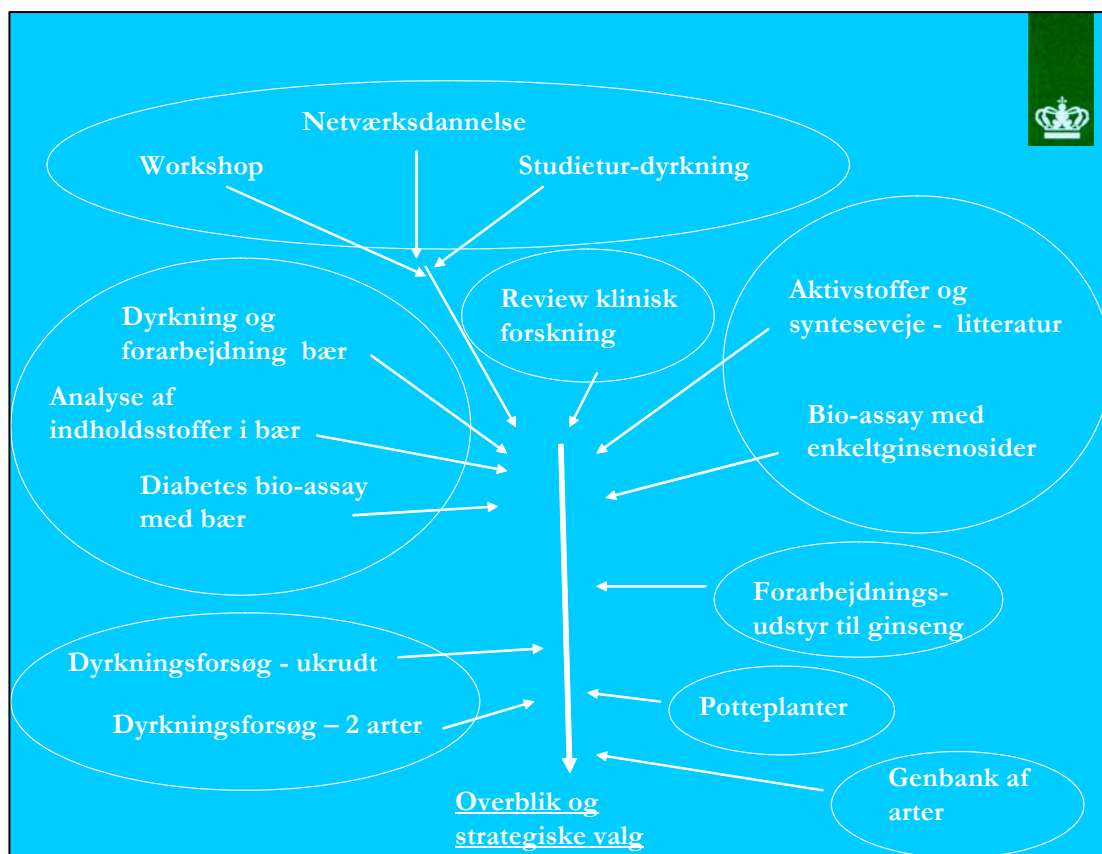
Deltagende partnere og økonomisk indsats



Figur 2. Fordeling af budgettets anvendelse på partnere.



Figur 3. Fordelingen af budgettet på delprojekter.



Figur 4. Skematisk oversigt over delprojekter og delprojektklynger.

Delprojekt: 1. Etablering af nationalt tværfagligt ginseng netværk

Af Palle Møldrup, Martin Jensen og Anne Jørgensen

Der blev indledende gennemført en screening af hvilke aktører, der arbejder eller har arbejdet med ginseng i Danmark på forskellige områder. Der blev taget kort kontakt til den overvejende del af disse for, at få opdateret status for deres aktiviteter og erfaringer med ginseng. Kontakterne herfra blev bl.a. brugt til, at sammensætte indholdet og pege på deltagere på ginseng workshopen i juni 2005. Resultatet af undersøgelsen viste, at der kun er ganske få ginseng avlere med kommerciel produktion i Danmark. Flere af disse er startet for 6-8 år siden, mens enkelte nye avlere har igangværende projekter. På forskningssiden har Rigshospitalet arbejdet med ginseng og især immunforsvarsaspekter de senere år, mens Landbohøjskolen (KVL) har udført kliniske undersøgelser af human indtagelse af ginseng. Vedr. planteforskning har DJF Årsløv siden 1996 haft aktiviteter og forsøgsplantninger af amerikansk ginseng, som opdateres løbende. Grønt Centers aktiviteter på ginseng er nu droslet ned til et minimum, men har tidligere haft væsentlige udviklings og formidlingsaktiviteter i relation til ginseng. En række firmaer producerer eller forhandler ginseng produkter som kosttilskud eller plantemedicin, dog endnu ikke fra dansk producerede råvarer.

Oversigt over ginseng aktører er vist i tabel 1.1.

På indledende projektmøder for dette delprojekt og på ginseng workshopen i juni (se indlæg af Palle Møldrup på workshop) blev der diskuteret forskellige modeller for en netværksdannelse inkl. evt. informationshjemmeside, specifikt på ginseng, men set i lyset af det begrænsede antal aktører, vurderes det urealistisk og uhensigtsmæssigt at forsøge at etablere og køre et særligt netværk alene for ginseng. Det anbefales i stedet, at lægge sig ind under de etablerede organisationer som f.eks. Krymeda, TCM Denmark mv. Et uformelt netværk er dog etableret via nærværende projekt, da de fleste aktører nu er bekendt med øvrige aktører, deres aktiviteter og kompetencer. De større handelsfirmaer har eksisterende alternative netværk/organiseringer i relation til lovgivning, og markedet har derfor måske ikke så stort et behov for yderligere netværksdannelse. En øget interaktion og informationsudveksling med forskningsinstitutioner, her især den kliniske og farmaceutiske forskning, vil potentielt kunne skabe videre udviklingspunkter for disse firmaer. Netværk mellem disse firmaer og danske ginseng avlere vurderes for nuværende ikke, at give det store udviklingspotentiale, da produktionsmængder er for små og de mere specielle produkter og kompetencer hos avlerne, der kunne give nyudvikling sammen med de farmaceutiske firmaer, endnu er under opbygning. For ginsengavlerne, herunder til prydblanteformål, kan det anbefales, at man overvejer at etablere ERFA grupper, således at man kan støtte hinanden med indledende erfaringer, herunder muligheder for samarbejde omkring afsætning og markedsføring, bl.a. med henblik på at opnå kritisk størrelse i markedet. En differentiering i

produktion i halvfabrikata og færdigvarer forudses på baggrund af den 3-4 årige dyrkningstid. Denne vil tillade en hurtigere tilbagebetalingstid for investeringer end en traditionel produktion.

Råvareproduktion af ginseng er endnu på et tidligt udviklingsstadium i Danmark og der er fortsat mange udfordringer i optimering af denne og behovet for rådgivning og information er derfor væsentlig. Potentialet for afsætning især på prydblomstområdet vurderes, at være meget større end den nuværende produktion og erfaringsudvekslinger via ERFA grupper bør derfor have flere positive end negative sider for disse firmaer.

Det vil være fordelagtigt for udnyttelsen af ginseng i Danmark såfremt centrale aktører, her bl.a. erhvervsorganisationerne, TCM Danmark konsortiet og forskningsaktørerne i fremtiden forsøger, at holde hinanden orienteret om udviklingen løbende.

Tabel 1.1. Nedenfor sammenstillede tabel indeholder data fra en grovscreening af ginseng aktører eller tidligere aktører, eller blot ginseng interesserede såvel danske som udenlandske. Listen er ikke udtryk for en komplet oversigt, men er tænkt som en første indgang til videre søgning af kontakter på ginseng.

Avlere - nuværende eller tidligere.

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
Jens Olsen	Højlunds Ginseng Dåstrup Hulvej 2 4130 Viby Sj. Tlf.: 21 64 37 05 Hojlunds@hojlunds.dk www.hojlunds.dk	Opstart: 1997 GC: Har fortsat lidt produktion.
Ole Have Rasmussen	Kongshave Ginseng Bjelkes alle 27, 1.tv 2200 København N Tlf.: 29 28 31 43	Opstart: ca. 1999. Stadig produktion og har foretaget udvidelse heraf
Poul Madsen	Grønt Center, Viden- og erhvervsudviklingscenter, indenfor jordbrugssektoren, samt den hertil knyttede industri. Tlf.: 54 60 70 00 Fax: 54 60 69 05	Gennemført forsknings projekt med dyrkning og forarbejdning af ginseng.
Per E. Andersen	Agersø Sundvej 3 Agersø 4230 Skælskør Tlf.: 58 19 80 69	Har erfaring fra pottedyrkning.

Thomas Nørgaard	Skagensvej 29, Uggerby, 9800 Hjørring Tlf.: 98 97 53 16 Marianne Hansen Skagensvej Tlf.: 98 91 00 72 / 30 62 65 32	Dyrket ginseng og erfaring med samdyrkning, mellem piletræer.
Poul Lang Nielsen	Søvej 103 5390 Martofte Tlf.: 65 34 14 10	Økologisk avler.
Poul Timmermann	Gartneriet Timmermann A/S, Skovgyden 10, 5450 Otterup, Tlf.: 64 82 19 38	Forsøgsdyrkning af potteplanter
Palle Fabricius	Gartnervænget 14, Åsum, 5240 Odense NØ Tlf.: 66 10 17 02 / 28 30 88 33	Forsøgsdyrkning af viderekultursplanter

Interesserede godser:

Kontakt person	Gods	Kommentar
Johan Scheel, Ejer	Ryegaard Gods	Har på nuværende tidspunkt et ginseng projekt.
Claudia Barfoed, Krydderurter og lægeplanter	Barritskov Gods	Har overvejet ginseng produktion

Forskning:

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
Arsalan Kharazmi, Forskningsleder	Rigshospitalets Mikrobiologiske Afdeling.	Kliniske tests af ginsengs virkning til at styrke immunforsvaret.
Z. J. Song, Kinesisk læge, ph.d.	Rigshospitalets Mikrobiologiske Afdeling.	Kliniske tests af ginsengs virkning til at styrke immunforsvaret.
Henrik Sørensen, Neuropsykolog	Skodsborg Sundhedscenter	Undersøgelser af ginsengs påvirkning på hjernen.
Jesper Sonne, Overlæge, dr. med. Klin.	Farmakologisk enhed, Amtssygehuset i Gentofte.	
Niels Højby	Klinisk Mikrobiologisk afd. Rigshospitalet.	Forsøg med ginsengs virkning på immunsvaret.
Steffen Bager, Cand. pharm.	Danmarks farmaceutiske Højskole -Lægemiddelstyrelsen	

Steen Honoré Hansen, Docent, dr. pharm.	Danmarks farmaceutiske Højskole. E-Mail shh@dfh.dk , Tlf.: + 45 35 30 62 56	
Søren Toubro	KVL. Institut for Human ernæring, ihe@kvl.dk , Soeren.Toubro@fhe.kvl.dk	
Lars Porskjær Christensen, adj.prof.	Danmarks JordbrugsForskning, Afd. Råvarekvalitet	Forsker og naturstof kemiker,
Martin Jensen seniorforsker	Danmarks JordbrugsForskning, Afd. for Havebrugsproduktion	Forsker, plantedyrkning, selektion, frøformering

Rådgivning:

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
Poul Madsen	Grønt Center Holeby Lolland	
Birthe Thode Jakobsen, Formand bioservice@mail.dk Tlf.: 62 60 22 08	Krymeda	

Medicinalvirksomheder:

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
Lars Lindmark Direktør	FERROSAN Sydmarken 4 2860 Søborg Tlf.: 39 69 21 11 Fax: 39 69 65 19 E-mail: info@ferrosan.com	Multi-tabs Active. Meget erfaring med ingefær bl.a. i relation til gigt.
Peer Christensen, Direktør Robert Green Nielsen, cand pharm. Flemming Pedersen,	NATUR-DROGERIET A/S Nydamsvej 13-15 DK-8362 Hørning Tlf.: 86 92 33 33 Fax: 86 92 33 43 E-mail: info@natur-drogeriet.dk	

Kirsten Milert, Beate Turner, Medical advisor Michael Møller Jensen, Sales director international,	DANSK DROGE Industrigrenen 10 2635 Ishøj Tlf.: + 45 43 56 56 56 Fax: + 45 43 56 56 00 E-mail: dd@danskdroge.dk	GERIMAX ginseng i tablet form samt flydende form
Kim Nielsen	Biosym Skolegade 49 DK-7430 Ikast e-mail:info@biosym.dk	Dansk virksomhed. Specialiseret i udvikling og fremstilling af stærke vitamin- og mineralpræparater samt naturlægemidler og kosttilskud.
Claus Jacobsen	A/S ANJO Mariendalsvej 57 2000 Frederiksberg Tlf.: 38 19 18 89 Fax: 38 33 33 45 E-mail: anjo@anjo.dk	Producerer og markedsfører naturlægemidler, kosttilskud gennem kliniske undersøgelser.
Lars Pedersen, direktør	Mezina A/S Energivej 2 - 4 DK-6700 Esbjerg Tlf.: (+45) 75 18 16 11. Fax: (+45) 75 13 81 72 E-Mail: mail@mezina.dk	Produkt : Enaxin
	HEIGAR CO Sorøvej 89-91 Vedbysønder 4200 slagelse Tlf.: 58 54 41 61 Fax: 58 54 42 95	Produkt: Rosenrod
	Wolles Nature System A/S Buesøvej 19, Kattinge 4000 Roskilde Tlf.: 46 40 28 67 Fax: 46 40 21 12 www.wolle.com E-mail: wolle@wolle.com	
	Oriental Care Tlf.: 70 26 33 88	Ginseng produkter

Internationalt

Forskning (USA):

Kontakt person	Organisation	Kommentar
Andy Hankins	Virginia State University 804 524 5962 ahankins@vsu.edu	Amerikansk ginseng ekspert.
	Wisconsin Ginseng Board ginseng@ginsengboard.com	
Ben B. Perry Executive Director	Appalachia - Science in the Public Interest 50 Lair Street, Mt Vernon KY 40456 Phone/Fax – 606 256 00 77 / 27 79 E-mail - benperry@a-spi.org	
Syl Yunker	Boone-Sang Cooperative Association, Inc. P.O. Box 717, Stanton, KY 40380	Has farmed ginseng for 14 years and has been involved with ginseng in Asia.
Randi Pokladnik, Doctoral student at Antioch University.	Randi@clover.net	Obstacles to ginseng and other medicinal herb markets.

Forskning (Canada):

Kontakt person	Organisation	Kommentar
	Delhi Research Farm Agriculture and Agri-Food Canada Schafer Road, P.O. Box 186 Delhi, ON N4B 2W9	
	The Ontario Ginseng Growers Association (OGGA). www.ginsenggrowers.com	Officiel repræsentant for Ontario's ginseng avlere.
	The Associated Ginseng Growers of British Columbia (TAGG).	TAGG og GGAC udgør 90 % af den canadiske ginseng produktion.
	The Ginseng Growers Association of Canada (GGAC).	

Australien:

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
Glenys Pearsall, AGGA Office Administrator pearsall@satlink.com.au	Australian Ginseng Growers Association Tlf: +61 3 59 68 13 21 Fax: +61 3 59 68 11 19 Mail: info@ginseng.org.au	

Holland:

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
	Euro Ginseng BV Postbus 86, 5460 AB Veghel Sporlaan 3-5, 5461 JX Veghel Tel: (0413)20 50 60 info@euroginseng.nl	Produktion af amerikansk ginseng

Tyskland

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
Gesine Wischmann direktør	Florafarm	Produktion og salg af koreansk ginseng

Kina:

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
	Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. Hang zhong Road, Nanjing , China Post Code: 210029 Fax: 0086 25 86 79 80 78 www.njutcm.edu.cn Int. tlf: 0086 025 86 79 80 79 Dom. tlf.: 025 86 79 80 04, 86 79 80 05 E-mail: caokai@njutcm.edu.cn	

Medicinalvirksomheder i Europa:

Kontakt person	Virksomhed	Kommentar
Uwe Meier, uwe.meyer@martin-bauer.de	Martin Bauer GmbH & Co. KG Bahnhofstr. 2 25486 Alveslohe Tel.: +49 (0) 4193 902 340 Fax: +49 (0) 4193 902 343 http://www.martin-bauer.com	Tysk Medicinalvirksomhed
	Holland and Barrett Samuel Ryder House Townsend Drive Attleborough Fields Nuneaton Warwickshire CV11 6XW http://www.hollandandbarrett.com	Engelsk Medicinalvirksomhed
Barbara Scarcy, Tlf personligt: 0041 91 610 31 11	Boehringer Ingelheim GmbH Corporate Headquarters Binger Str. 173 55216 Ingelheim Germany	Parmathon SA: International competence center for Natural Health products. Lugano, Switzerland.
	Gisand Tlf: 0041 31 332 31 13	Switzerland

2. Afholdelse af tværfaglig workshop/seminar

Af Martin Jensen, Palle Møldrup og Anne Jørgensen

Med henblik på, at bringe ginseng aktører sammen og skabe et fælles overblik over kompetencer og aktiviteter på ginseng, blev der den 9. juni 2005 afholdt en Ginseng workshop, med en række indlæg primært danske og med Gesine Wischmann fra Florafarm i Tyskland som inviteret hovedtaler. Indlæggene dækkede områder fra praktisk dyrkning af ginseng både som råvare til plantemedicin/kosttilskud eller til prydblade, til forarbejdning, selektion af plantemateriale, rådgivning, lovgivning omkring kosttilskud og plantemedicin, forskning i indholdsstoffer og kliniske effekter, herunder et review af de seneste års internationale klinisk veldokumenterede forskning på ginseng. Se programmet over workshoppen nedenfor. Der blev diskuteret ivrigt på workshoppen, herunder bl.a. de akutte problemer omkring ændringer af lovgivning på firmaernes muligheder. Der blev generelt udtrykt stor tilfredshed med workshoppen og skabt kontakter på tværs af aktørerne. Alle power point præsentationer fra workshoppen blev efterfølgende lagt på Udviklingscenter Årsløvs hjemmeside, så alle kunne studere detaljerne efterfølgende.

Tabel 2.1 Program over Ginseng workshop 9. juni 2005 afholdt ved Danmarks Jordbrugs Forskning i Årsløv. Omkring 45 personer deltog i workshoppen.

9:30	Velkomst / John Henriksen, Leder af UCAA Kaffe og te Smagsprøver på ginsengsnaps og ginsengbrød.
9:35	Introduktion til projekt og workshop formål. / Martin Jensen, Seniorforsker, projektleder. DJF
9:45	“The ginseng experience at Florafarm” / Gesine Wischmann, Direktør, Florafarm
10:45	Sammenligning af amerikansk og koreansk ginsengdyrkning i Danmark samt omtale af afsætningsforhold / Ole Have Rasmussen, Cand. Scient. Kongshave Ginseng
11:00	Praktiske dyrkningserfaringer og forsøg / Poul Madsen, Cand. Scient. Grønt Center
11:15	Ginseng: Forskning og udvikling ved DJF / Martin Jensen, Seniorforsker, DJF

- 11:30 Ginseng som potteplante / Martin Jensen, Seniorforsker, DJF
- 11:40 Netværksdannelse og rådgivningsmodeller for ginseng / Palle Møldrup, Afdelingschef. FEC
- 11:45 Diskussion af praktisk dyrkning
- 12:00 Ginsenosider og polyacetylen: biologisk aktivitet og biosyntese / Lars Porskjær Christensen, Adjung professor. DJF-ARK
- 12:20 Frokost
- 13:10 Krav og godkendelse af ginseng som lægemiddel. Aflyst / (Steffen Bager) Lægemiddelstyrelsen.
- 13:25 Krav og godkendelse af ginseng som kosttilskud / Helle Egebjerg Andersen. Fødevarestyrelsen.
- 13:40 Review af den seneste kliniske forskning på ginseng / Tanja Bidstrup, Cand. Scient, Ph.D. OUH
- 14:10 Kaffepause
- 14:40 Effects of Chinese ginseng on Chronic *P. aeruginosa* lung infection in animal models mimicking cystic fibrosis / Szhijun Song, MD, Ph.D. Rigshospitalet.
- 15:10 Panax ginseng og type 2 diabetes / Christel Damsgaard, Cand. Scient i human ernæring.
- 15:30 Syntese af viden og diskussion af strategier for forskning og udvikling. / Ordstyrer: Martin Jensen.
- 16:00 Afslutning

3. Studietur til europæiske ginseng producenter/europæiske ginseng aktiviteter

Anne Jørgensen, Martin Jensen og Poul Madsen

Som et tilbud til ginseng interessenter blev, der udbudt en 2 dages studietur til Tyske/Hollandske ginseng avlere midt på sommeren 2005. Den eksterne tilmelding var dog så begrænset, at det blev valgt at aflyse studieturen. Mulighederne for, at opnå flere tilmeldinger senere på efteråret vurderedes at være lille, hvorfor det blev valgt at kanalisere nogle af de afsatte midler til studieturomkostninger til andre aktiviteter.

Der er gennemført en screening af europæiske aktører på ginseng via søgning på internet, i tidsskrifter, Gartnerinfo Databasen over populære artikler ved Gartnertidende mv. Selvom søgningen ikke nødvendigvis har fundet alle ginseng interessenter i Europa, har resultatet vist at der kun er meget begrænsede aktiviteter på produktion af ginseng i Europa. Florafarm i Tyskland vurderes for øjeblikket, at være den største europæiske producent (koreansk ginseng) og har kombineret primærproduktion med rundvisninger og butikssalg mv., for at opnå et tilpas stort forretningsgrundlag (se præsentation på ginseng workshop). Herudover er der fundet 2 mindre tyske producenter, der vurderes at være på hobby eller deltidsniveau. I Holland har firmaet EUROGINSENG tidligere haft en relativ stor og professionel produktion af amerikansk ginseng, men har tilsyneladende haft afsætningsproblemer og produktionsaktiviteter ser derfor ud til at blive droslet ned. Den tidligere produktionsleder i firmaet EUROGINSENG, har i 2005 etableret egen virksomhed bl.a. også med ginseng. På baggrund af deltagerlisten fra den 1. Europæiske Ginseng Konference i Marburg, Tyskland i 1998, vurderes at der findes enkelte mindre producenter/avlere i andre lande også, herunder Frankrig, og der har været forsøg med ginseng dyrkning i bl.a. Polen. Der er dog ikke fundet yderligere informationer om status hos disse.

Der er ikke fundet produktioner af eller forskning i anvendelse af ginseng som pryddplanter i andre europæiske lande. Danmark ser derfor ud til, at være foran i udviklingen af denne nicheproduktion. Tilsvarende ser det ikke ud til, at der foregår større forskningsindsatser på dyrkning/produktion af ginseng i andre europæiske lande for øjeblikket. Det kan dog ikke udelukkes at sådanne findes, men endnu ikke er formidlet til offentligheden i væsentlig omfang.

Der findes en række farmaceutiske firmaer som producerer kosttilskud eller plantemedicinprodukter af koreansk ginseng, som er den eneste ginseng art, der er godkendt i EU som plantemedicin. Det vurderes at råvarer til denne produktion altovervejende importeres fra Asien.

Ginseng drogeråvarer fremstilles og sælges af enkelte større engrosfirmaer i Europa, f.eks. handelsfirmaet Martin Bauer i Tyskland og firmaet Cognis i Spanien (eksstraktionsfabrik i Palafolls, Barcelona, bl.a. CO₂ kritisk ekstraktion).

Indenfor forskning har der yderligere været kontakt til Stephen Fulder fra Israel, som er ginseng ekspert og har været med i en række tidligere projekter på ginseng og publiceret adskillige artikler om effekter mv.

Der er ikke gennemført et særskilt studie af hvilken klinisk forskning, der foregår på ginseng i Europa, men det vurderes generelt at være begrænset, og ofte knyttet til undersøgelser af effekter af de få større farmaceutiske firmaers produkter.

I tabellen er nævnt de få europæiske aktører indenfor ginseng, som er fundet i søgningen.

Tabel 3.1. Europæiske ginseng aktører og organisationer

Kontaktperson	Organisation	Kommentarer
	Euro Ginseng BV Postbus 86, 5460 AB Veghel Sporlaan 3-5, 5461 JX Veghel Tel: (0413) 20 50 60 info@euroginseng.nl	
Ben Schepens, info@benseng.nl	Benseng International BV Rietven 157 5464 PJ Veghel Holland	Tidligere chef for Euro Ginseng. Som har startet egen virksomhed. www.benseng.nl
Bart Ottens, Secr. Gen. Ottens.bart@hetnet.nl	Europam	European Herb Growers Association.
Simon Tunnard, simon@euroginseng.co.uk	Euroginseng Stratton Farm Great North Road Biggleswade Bedfordshire SG18 9SX Tel: 01767 313 291 Fax: 01769 601 150	England. Cooperating with Euroginseng.
	Emmentaler Ginseng webmaster@panax.ch www.Panax.ch	Switzerland. Cultivating for 4 years. Cooperating with Euroginseng

<p>Gesine Wischmann, Gesine.wischmann@florafarm.de</p>	<p>Florafarm FloraFarm GmbH Bockhorn 1 29664 Walsrode Fon: (0 51 62) 13 93 oder 0800-florafarm (kostenlose Service- Nummer) Fax: (0 51 62) 29 39 E-Mail: info@florafarm.de Tyskland</p>	<p>Cultivation Korean ginseng.</p> <p>Gesine Wishmann gave a presentation of their marketing strategy at the International Ginseng Conference in Australia.</p>
	<p>Ginsenghof Gräfendorf GmbH Am Wasserwerk - Brennerei 14913 Gräfendorf kontakt@ginsenghof.com www.ginsenghof.com</p>	<p>Cultivating ginseng for 6 years. Own company.</p>
<p>Peter Klock,</p>	<p>Südflora Stutsmoor 42 22607 Hamburg 0049 (0) 40/89 91 698</p>	<p>Selling small ginseng plants to private gardeners.</p>

4. Review af klinisk dokumentation på ginseng

Tanja Bidstrup, Kim Brøsen, Martin Jensen, Lars Porskjær Christensen, Karsten Kristiansen, Morten Kobæk-Larsen.

I forståelsen af ginsengs potentialer og effekter er det afgørende, at være fuldt opdateret med den internationale viden. Da der løbende forskes meget i ginseng på verdensplan har det derfor været et mål for projektet, at tilvejebringe et opdateret state of the art på virkningen af ginseng klinisk og præklinisk.

Læge og Ph.d. Tanja Bidstrup har under vejledning af Professor Kim Brøsen, OUH og med en støttegruppe bestående af projektleder Martin Jensen, adjung professor leder Lars Porskjær Christensen og professor Karsten Kristiansen, gennemført et review af de sidste ca. 4-5 års kliniske forskning på effekten af ginseng hos mennesker. Reviewet omfatter overvejende forsøg udført med høj vestlig standard, dobbelt blindforsøg med placebo effekter mv. men nævner herudover enkelte interessante særlige resultater. Essensen af reviewet er formidlet mundtligt dels på Ginseng konferencen i juni 2005 og dels på TCM Denmarks conference i oktober 2005 til et internationalt forum. Reviewet er vedlagt her, men er derudover publiceret særskilt som DJF Rapport, Havebrugsserien i januar 2006.

En supplerende ansøgning til VIFAB i foråret 2005 om midler til, at udføre et særligt review med Kinesisk/ Asiatisk sproget litteratur blev desværre ikke bevilget og derfor ikke gennemført.

Udover reviewet af de kliniske forsøg på mennesker blev det muligt, at gennemføre et særskilt review af prækliniske dyreforsøg med ginseng. Dette blev gennemført af ph.d. Morten Kobæk-Larsen ved Biomedicinsk Institut, SDU og giver en oversigt over den nyeste forskning på området.

De to fulde review er inkluderet her. Begge reviews omfatter højt specialiseret forskning og er derfor gennemført på engelsk for, at give reviewet størst mulig gennemslagskraft/synlighed internationalt.

Review of recent reported clinical effects of ginseng

Tanja Busk Bidstrup, Clinical Pharmacology, University of Southern Denmark

Kim Brøsen, Clinical Pharmacology, University of Southern Denmark

Correspondence:

Tanja Busk Bidstrup

Clinical Pharmacology

University of Southern Denmark

Winsloewparken 19³, 5000 Odense C, Denmark

Direct dial: (+45) 65 50 37 59

Fax: (+45) 65 91 60 89

E-mail: tbidstrup@health.sdu.dk

The work was carried out at Clinical Pharmacology, University of Southern Denmark, Winsløwparken 19², 5000 Odense C, Denmark

Summary

Ginseng has been used as an herbal remedy in Asia for thousands of years and it has been claimed effective in improving several disorders and general health functions including cancer, diabetes, cardiovascular disorders, immune functions, vitality, sexual function, cognitive and physical performance. But early clinical trials (from before the mid 1990s) aimed to test the efficacy of ginseng used for any of the claimed indications have yielded contradictory results.

The aim of this review was to collect and report the results of more recent clinical trials of ginseng (***Panax*** species). We would like the review to allow identification of any possible interesting results or indications that deserve further investigation in the future.

The review indicates that an obvious future research area is the use of American ginseng (***Panax quinquefolius***) in the treatment of diabetes. Other possible areas where positive effects could be expected are cancer, lung infections and perhaps hypertension. But further studies are still needed to evaluate the possible clinical effects of ginseng.

Content

Introduction.....	22
Physical and psychological functions	24
Cognitive performance and mood.....	24
Physical performance.....	26
Menopausal symptoms.....	27
Diabetes.....	28
Lung infections.....	32
Cancer	33
Hypertension	33
Miscellaneous	34
Drug interactions and effects on enzymes.....	35
Conclusions and possible future research areas.....	37
References	38

Introduction

Through the years several *in vitro* and *in vivo* studies have indicated a protective effect of ginseng against development of disease, as well as a possible, positive effect on several disease states. The market for ginseng is greatly increasing, as it is largely used by both healthy individuals, as a nutritional supplement and by patients, often in combination with a prescribed drug.

Ginseng appears to be a very difficult drug to investigate, for several reasons. For example, is it possible that a very long duration of treatment is necessary to gain any long term positive effect? Furthermore does a lot of different species of ginseng exist and it is possible that they each have very different properties. The four main species of ginseng are: American, Chinese, Korean, and Japanese. Three medical species are currently recognised: *Panax ginseng* C.A. Meyer (Korean ginseng), *Panax japonicus* C.A. Meyer (Japanese ginseng) and *Panax quinquefolius* (American ginseng) (Bahrke and Morgan, 2000). The main constituents of ginseng root are the saponins or ginsenosides, which are glycosylated steroids and these, are the possible pharmacological active components of ginseng. At least 13 saponins/ginsenosides have been isolated from *P. ginseng* roots. These are named ginsenoside R_x , where x is a, b1, b2, c, d, e, f, g1, g2, g3, h1, h2 or o according to their position on thin layer chromatograms (Shibata et al., 1965). Only two ginsenosides are common to Japanese, Chinese, Korean and American ginseng, namely R_{g2} and R_o (Bahrke and Morgan, 2000). The content of each of the ginsenosides in a ginseng preparation varies a lot and probably depends on several factors such as the species of ginseng, cultivation methods, age of the plant at harvest (generally 6-7 years), season the plant is harvested (autumn is recommended (Bahrke and Morgan, 2000)) and preparation of the root (for example is “red ginseng” the steamed and air-dried root, whereas “white ginseng” is the air-dried root. Ginseng steamed at 120 °C has been reported to be more pharmacological active and have a higher content of ginsenosides R_{g3} and R_{g5} than raw ginseng (Kim et al., 2000)). All these different factors may

complicate comparison of trials, investigating the efficacy of ginseng used for different indications.

Recent studies indicate that it may not only be the root of ginseng that possesses pharmacological activities. Lately have both the leaves and the berries of American ginseng and the berries of Korean *Panax ginseng* shown anti-hyperglycemic activities in diabetic *ob/ob* mice (Dey et al., 2003; Xie et al., 2002; Xie et al., 2004b; Xie et al., 2004a) and the berries of American ginseng have actually shown a more potent anti-hyperglycemic activity than the root (Dey et al., 2003). And to complicate the use of ginseng further, have an investigation shown that some commercial ginseng products actually do not contain any true ginsenosides (Cui et al., 1994). Differences in efficacy and content of ginsenosides of American ginseng (cultivated *Panax quinquefolius* L.) depending on the batch have also been demonstrated (Sievenpiper et al., 2003a).

G115, marketed under the name Ginsana (GLP Ginsana Products SA, Lugano, Switzerland), is an extract of Korean *Panax ginseng* that contains a standardized concentration of 13 ginsenosides and lately this has been used in clinical trial set-ups of the effects of ginseng, to overcome some of the above mentioned problems.

In 1999 Vogler et al. reported the results of a systematic review of double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trials of ginseng root extract for any indication (Vogler et al., 1999). Sixteen trials were included and actually 10 of these showed a significant ($P < 0.05$), beneficial effect on the measured effect parameters of the respective trials. These effect parameters included physical performance, immunological parameters, psychomotor performance, cognitive behavior and reduction in blood glucose levels in type II diabetic patients. Four of the 16 trials included in the review did not show a significant beneficial effect of ginseng on physical performance, one did not show an effect on psychomotor performance and cognitive behavior and one trial did not show a beneficial effect on immunological parameters. So the evidences for an effect of ginseng on the mentioned indications were still in 1999 contradictory and the authors came to the conclusion that more rigorous investigations were needed to assess the possible efficacy of ginseng.

The aim of the present review was to collect and report the results of more recent clinical trials of ginseng (*Panax* species). The review should allow identification of possible interesting results or indications that deserve further investigation in the future. All identified, preferentially randomized, placebo-controlled and blinded, clinical studies of the use of *Panax* species for any indication, from the late 1990s to early 2005 were included. In some areas, interesting results of *in vitro* or *in vivo* animal studies were furthermore included.

Physical and psychological functions

Some of the most investigated areas of the effects of ginseng are the influence on physical and psychological functions including effects on cognitive behavior, mood, quality of life, prevention of stress and general diseases and recovery from physical exercise.

Cognitive performance and mood

Several studies using animal models have shown improvement of cognitive functions like learning and memory after treatment with ginseng (Nishijo et al., 2004; Petkov et al., 2003). Human studies of the effects on cognitive performance have yielded contradictory results.

In a randomized double-blind study employing 112 healthy subjects above 40 years of age, no significant difference in the results of psychomotor, attention, learning and memory tests, measured before and after 8-9 weeks treatment with either placebo or 400 mg ginseng tablets (Gerimax Ginseng Extract, Dansk Droge A/S, Ishøj, Denmark. Purity and content of ginseng not reported), were observed (Sørensen and Sonne, 1996). The ginseng group did show a tendency to better abstract thinking and faster reaction times than the placebo group but the results were not significant.

In a double-blind, placebo-controlled randomized, crossover study employing 20 healthy subjects the effect of a single dose of either 0 (placebo), 200, 400 or 600 mg ginseng extract (G115, Pharmaton SA, standardized to contain 4 % triterpenoid glycosides/100 mg) on accuracy and responses were measured (Scholey and Kennedy, 2002). There was a washout period of 7 days between each treatment/study day. Scores on two computerized subtraction tasks were assessed pre-dosing and at 1, 2.5, 4 and 6 hours after dosing. 200 mg ginseng significantly slowed responses at all time points post-dosing compared to placebo, but it also significantly improved the accuracy at 4 h after dosing. 400 mg ginseng significantly improved accuracy at 4 and 6 h time points post-dosing. The crossover design of this study allowed each subject to be his or her own control. This controls for any possible interindividual variability that may influence the measured parameters. On the other hand it can be that the washout period not was long enough, which would lead to carryover effects in study courses where treatment consisted of ginseng during the first, second and/or third visit. In another randomized placebo-controlled, double-blind study, administering a single dose of 400 mg *P. ginseng* extract (G115, Pharmaton) to 20 healthy subjects, improvement of memory, speed and accuracy in different cognitive performance tests were observed (Kennedy et al., 2002). Following a baseline cognitive assessment, further test sessions took place 1, 2.5, 4, and 6 h after the day's treatment was taken. The most striking effect in the study was the improvement in memory performance following ginseng treatment. Ginseng treatment did not significantly affect mood measured with Bond-Lader visual analogue scales.

A very recent study performed by the same group as the two previously mentioned studies, yielded similar results (Kennedy et al., 2004). This was a double-blind, placebo-controlled study employing 28 healthy subjects. The effect of a single dose of 200 mg ginseng extract (G115) on subjective mood and cognitive performance, measured pre-dosing and at 1, 2.5, 4 and 6 hours after dosing, was investigated. In comparison to placebo, ginseng improved the performance in several of the cognitive performance tests throughout the day. No significant improvement of mood was observed.

In contradiction to these three studies showing improved cognitive performance after a single dose of ginseng (G115), another recent study found no difference in the scores of several memory tests, between a group of subjects who had been taking ginseng supplement (brand or types not reported) for 2 years or more (n=86) compared to age- and education-matched control groups who had been either taking no supplements (n=86) or had been taking vitamin supplements only (n=86) (the latter group was included to control for possible effects based on general health awareness) (Persson et al., 2004).

A double-blind, randomized study has assessed the effects of Gericomplex (containing 40 mg ginseng extract G115, vitamins, minerals and trace elements) twice daily for 12 weeks, on quality of life and mood. A group of 205 healthy, employed subjects receiving the ginseng complex were compared to 185 healthy, employed subjects who received placebo.

Significantly improved alertness, relaxation, appetite and overall score were observed after ginseng complex treatment (Wiklund et al., 1994). In a subgroup of the subjects with the 20% lowest score at baseline, the ginseng complex improved both vitality and depressed mood, indicating that subjects with poorest quality of life benefited the most from the ginseng treatment.

Another randomized placebo-controlled, double-blind clinical trial aimed to examine the possible effects of ginseng on mood as well (Cardinal and Engels, 2001). Eighty-three healthy young adults were randomly assigned to receive placebo, 200 mg or 400 mg ginseng capsules (*Panax ginseng* C.A. Meyer concentrate G115, Pharmaton Ltd, Lugano, Switzerland) for 60 days. Positive affect, negative affect and total mood disturbance were measured using different scaling tests, before and after the ginseng/placebo-intervention. No significant effects of ginseng were observed on positive affect, negative affect or total mood disturbance.

To assess the time-dependent effects of *Panax ginseng* on health-related quality of life (HRQOL) by use of a general health status questionnaire, 30 healthy young subjects were randomized in a double-blind manner to *P. ginseng* 200 mg/day (Ginsana) (n = 15) or matching placebo (n = 15) for 8 weeks (Ellis and Reddy, 2002). The Short Form-36 Health Survey version 2 (SF-36v2), a validated general health status questionnaire, was used to assess HRQOL at baseline and after 4 and 8 weeks of treatment. There were no significant differences in baseline demographics and baseline SF-36v2 scores between the groups. After 4 weeks of therapy, slightly higher scores in social functioning (*P. ginseng* 54.9+/-4.6 vs. placebo 49.2+/-6.5; *P* = 0.014), mental health (*P. ginseng* 52.2+/-7.7 vs. placebo 47.2+/-7.3; *P* = 0.075), and the mental component summary (*P. ginseng* 51.3+/-7.4 vs. placebo 44.3+/-

8.3; $P = 0.019$) scales were observed in subjects randomized to *P. ginseng*. These differences did not persist to the 8-week time point. The incidence of adverse effects was 33 % in the *P. ginseng* group compared with 17 % in the placebo group ($P = 0.40$). Subjects given *P. ginseng* (58 %) were more likely to state that they received active therapy than subjects given placebo (17 %; $P < 0.05$) and they were significantly more likely to state that they felt differently during treatment.

Physical performance

Recent studies of the ability of ginseng to improve physical performance have not found evidence of any increase of for example maximal exercise capacity or positive influences on hormonal indices of stress during exercise. Only a single study has found improvement of different pulmonary function tests and Maximal Oxygen Consumption after ginseng treatment in patients with moderately-severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease (Gross et al., 2002).

In a placebo-controlled, double-blind clinical trial, thirty-one healthy young men were randomly assigned to receive placebo (n=10), 200 mg (n=11) or 400 mg (n=10) ginseng capsules (*Panax ginseng* C.A. Meyer concentrate G115, Pharmaton Ltd, Lugano, Switzerland) for 60 days (Engels and Wirth, 1997). Submaximal and maximal aerobic exercise responses were measured before and after the intervention. Ginseng supplementation had no significant effect on oxygen consumption, respiratory exchange ratio, minute ventilation, blood lactic acid concentration or heart rate.

Another group studied the effect of a commercially manufactured standardized 200 mg dosage of 7 % *Panax ginseng* for 21 days on peak aerobic exercise performance (Allen et al., 1998). Twenty young men and eight young women were randomly assigned to ginseng (n=13) or placebo (n=15) treatment in a double-blind design. Physical performance (symptom limited graded exercise test) on an ergometer was measured prior to and following treatment. No significant effect of ginseng treatment was observed for oxygen uptake, exercise time, workload, plasma lactate or hematocrit at peak levels, or for heart rate.

A randomized placebo-controlled clinical trial assessed the effects of *Panax ginseng* (4 mL 60 % ethanolic *P. ginseng* extract, equivalent to 2 g/day of dried root, Mediherb Pty. Ltd., Warwick Queensland, Australia, diluted with 4 mL distilled water) for six weeks on competitive club-level endurance athletes engaged in their normal training (Gaffney et al., 2001). Sample size in this study was rather small as only 6 of the subjects receiving ginseng and 6 of those receiving placebo, completed the study. Before and after the interventions different measures of stress response (cortisol, testosterone, testosterone to cortisol ratio) and selected markers of the immune system status (circulating T-cells, T-helper cells (CD4), T-suppressor cells (CD8), CD4 to CD8 ratio, natural killer cells and B lymphocytes) were measured. Neither the immune system variables nor the endocrine components were changed significantly nor showed any clear trend from pre to post test in any of the two treatment groups (Gaffney et al., 2001).

To evaluate the effects of ginseng extract (G115) on Pulmonary Function Tests (PFTs), Maximum Voluntary Ventilation (MVV), Maximum Inspiratory Pressure (MIP) and Maximal Oxygen Consumption (VO_{2max}), 92 patients with moderately-severe Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) were randomly divided in groups to receive G115 100 mg (Ginsana, Pharmaton Ltd, Lugano, Switzerland) twice daily for three months ($n = 49$) or placebo ($n = 43$) (Gross et al., 2002). PFTs, MVV and MIP were studied before treatment and every two weeks for the 3-month-study period. Exercise test and VO_{2max} measurements were performed before the beginning and after six weeks and three months. Baseline demographics and pulmonary parameters were similar between the groups. In the ginseng, but not in the placebo group, all parameters significantly increased above baseline and compared with the placebo group. No side effects were observed. It was concluded that G115 100 mg twice daily for three months, but not placebo, improved PFTs, MVV, MIP and VO_{2max} in patients with moderately-severe COPD.

In another randomized placebo-controlled, double-blind clinical trial, twenty-seven healthy young men supplemented their diet with placebo ($n=12$) or 400 mg ($n=15$) ginseng capsules (***Panax ginseng*** C.A. Meyer concentrate G115, Pharmaton Ltd, Lugano, Switzerland equivalent to 2 g ***P. ginseng*** C.A. Meyer root material) for 60 days (Engels et al., 2003). The aims of the study were to examine the effects of prolonged ginseng supplements on secretory immunoglobulin A (SIgA), physical performance and recovery responses of individuals undergoing exhausting interval exercise. SIgA is the primary immunoglobulin contained in secretions of the mucosal immune system, and its levels in salivary fluids correlate more closely with resistance to respiratory infections caused by certain viruses, than do serum antibodies or other immune parameters (Engels et al., 2003). Before and after ginseng or placebo intervention each subject performed three 30-second Wingate tests interspersed with 3-minutes recovery periods. SIgA secretion rate, peak and mean mechanical power output and exercise recovery heart rate was determined. Postintervention minus preintervention change scores for SIgA secretion rate, exercise performance and recovery heart rate were similar between ginseng- and placebo-treated groups ($P>0.05$) (Engels et al., 2003).

Menopausal symptoms

Very few studies of the effects of ginseng on menopausal symptoms have been performed. Because ginseng have been reported to have estrogenic effects (Cho et al., 2004) and because positive effects on stress and mood furthermore have been stated, possible positive effects in postmenopausal women have been speculated. But also in this area a bit contradictory results have been obtained.

The effects of 6 g Korean red ginseng (the root of ***Panax ginseng*** C.A. Meyer) daily for 30 days, on the degree of psychological dysfunction and levels of stress hormones, were measured in 12 postmenopausal women with climacteric syndromes (Tode et al., 1999) and the levels were compared to the levels of 8 postmenopausal women without any climacteric syndromes, who were not treated. Ginseng treatment decreased the scores of psychological

tests to normal range and significantly decreased the cortisol to dehydroepiandrosterone-sulfate ratio, which are stress-related hormones thought to be of importance for psychological functions such as depression and memory dysfunction in postmenopausal women (Tode et al., 1999). The study had several limitations, which should be recognized; it was not randomized, blinded or placebo-controlled. Furthermore was the sample size very small and the supplier of the ginseng used was not stated.

A randomized, multicenter, double-blind study assessed the effects of 200 mg standardized ginseng extract (Ginsana, G115, GLP Ginsana Products SA, Lugano, Switzerland) compared with those of a placebo on quality of life and physiological parameters in 384 symptomatic postmenopausal women (Wiklund et al., 1999). Validated questionnaires (Psychological General Well-Being (PGWB) index, Women's Health Questionnaire (WHQ)) and Visual Analogue (VA) scales were used to assess the quality of life at baseline and after 16 weeks' treatment with either the ginseng extract or placebo. The efficacy of ginseng on postmenopausal symptoms, physiological parameters (follicle-stimulating hormone (FSH) and estradiol levels, endometrial thickness, maturity index and vaginal pH) was recorded at the same time points. Of the 384 randomized patients (mean age 53.5 +/- 4.0 years), the questionnaires were completed by 193 women treated with ginseng and 191 treated with placebo. The group treated with ginseng showed only a tendency for a slightly better overall symptomatic relief ($P < 0.1$). Exploratory analysis of PGWB subsets, however, reported P -values < 0.05 for depression, well-being and health subscales in favor of ginseng compared with placebo. No statistically significant effects were seen for the WHQ and the VA scales or the physiological parameters, including vasomotor symptoms (hot flushes).

In a double-blind, placebo-controlled study, post-menopausal women aged 51-66 were randomly assigned to 12 weeks' treatment with Gincosan (320 mg/day, Pharmaton SA, Switzerland, containing 120 mg Ginkgo biloba (GK501), and 200 mg *Panax ginseng* (G115)) (n=30), or matched placebo (n=27) (Hartley et al., 2004). They were given measurements of mood, somatic anxiety, sleepiness, and menopausal symptoms and a battery of cognitive tests before treatment and after 6 and 12 weeks of treatment. There were no significant effects of Gincosan treatment on ratings of mood, bodily symptoms of somatic anxiety, menopausal symptoms, or sleepiness or on any of the cognitive measures of attention, memory or frontal lobe function.

Diabetes

In the recent years several clinical studies have shown positive effects of ginseng on blood glucose levels both in diabetic patients and healthy individuals. One study was published in 1995 (Sotaniemi et al., 1995) and this study was included in the review by Vogler et al. from 1999 (Vogler et al., 1999). As mentioned in the introduction this group found reduction in fasting blood glucose levels in 24 newly diagnosed type 2 diabetic patients after 8 weeks treatment with 100 mg or 200 mg ginseng (Dansk Droge, Copenhagen) compared with 12 patients taking placebo. The study was double-blinded and randomized. The ginseng therapies furthermore elevated mood and improved psychophysical performance. The 200-

mg dose of ginseng in addition to this significantly improved glycated hemoglobin (HbA_{1c}) and serum aminoterminalpropeptide (PIIINP). After publication of this study several clinical studies on the effects of ginseng treatment on blood glucose levels have been performed by a group of Canadian researchers from St. Michael's Hospital in Toronto:

Ten nondiabetic individuals were randomized to on 12 separate occasions receive a single dose of 0 (placebo), 3, 6 or 9 g of ground American ginseng root (*Panax quinquefolius L.*) at 40, 80, or 120 minutes before a 25 g oral glucose challenge (Vuksan et al., 2000a). Capillary blood glucose was measured prior to ingestion of ginseng or placebo capsules and at 0, 15, 30, 45, 60 and 90 minutes from start of challenge. Compared with the placebo, 3, 6 and 9 g of ginseng reduced ($P<0.05$) postprandial incremental glucose at 30, 45 and 60 minutes; also, 3 and 9 g of ginseng did so at 90 minutes. The 9 g ginseng dose administered 60 minutes before the glucose challenge, reduced incremental postprandial glucose relative to 3 g of ginseng ($P<0.05$). All ginseng doses reduced ($P<0.05$) area under the incremental glucose curve (3 g, 26.6 %; 6 g, 29.3 %; 9 g, 38.5 %). Ginseng taken at different times did not have an additional influence on postprandial glycemia. The authors conclude that in nondiabetic individuals, 3, 6 or 9 g of American ginseng taken 40, 80 or 120 minutes before a glucose challenge similarly improved glucose tolerance.

In another study 10 nondiabetic subjects and 9 subjects with type 2 diabetes mellitus were randomized, on 4 separate occasions with minimum one weeks washout between each visit, to receiving 3 g American ginseng (*Panax quinquefolius L.*) or placebo capsules, either 40 minutes before or together with a 25-g oral glucose challenge (Vuksan et al., 2000b). A capillary blood sample was taken fasting and then at 15, 30, 45, 60, 90, and 120 (only for subjects with type 2 diabetes mellitus) minutes after the glucose challenge. In nondiabetic subjects, no differences were found in postprandial glycemia between placebo and ginseng when administered together with the glucose challenge. When ginseng was taken 40 minutes before the glucose challenge, significant reductions in area under the glycemic curve (18 % +/- 31%) were observed ($P<0.05$). In subjects with type 2 diabetes mellitus, significant reductions in area under the glycemic curve were observed both when ginseng was taken 40 minutes before (19 % +/- 22 %) and together (22 % +/- 17 %) with the glucose challenge ($P<0.05$).

In a similar study were ten type 2 diabetic patients (6 men, 4 women) randomly administered 0 g (placebo) or 3, 6, or 9 g ground American ginseng (*Panax quinquefolius L.*) root in capsules (Ontario-grown ground root of American ginseng, Chai-Na-Ta Corp., British Columbia, Canada) at 120, 80, 40, or 0 min before a 25-g oral glucose challenge (Vuksan et al., 2000c). Capillary blood glucose was measured before ingestion of ginseng or placebo and at 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 min from the start of the glucose challenge. Two-way analysis of variance (ANOVA) demonstrated that treatment (3, 6, and 9 g ginseng) but not time of administration (120, 80, 40, or 0 min before the challenge) significantly affected postprandial glycemia (PPG) ($P<0.05$), with significant ($P = 0.037$) interaction for area under the curve (AUC). Pairwise comparisons showed that compared with 0 g (placebo), 3, 6, or 9 g significantly ($P<0.05$) reduced AUC (19.7 %, 15.3 %, and 15.9 %, respectively) and

incremental glycemia at 30 min (16.3 %, 18.4 %, and 18.4 %, respectively), 45 min (12.5 %, 14.3 %, and 14.3 %, respectively), and 120 min (59.1 %, 40.9 %, and 45.5 %, respectively). However, pairwise comparisons showed no differences between the 3-, 6-, or 9-g doses and any of the times of administration. Ginseng reduced PPG irrespective of dose and time of administration. No more than 3 g ginseng was required at any time in relation to the challenge to achieve reductions in postprandial glycemia.

In another randomized placebo-controlled, single-blinded, crossover study, 12 healthy subjects (7 men and 5 women) received 16 treatments: 0 (placebo), 1, 2, or 3 g American ginseng (*Panax quinquefolius* L. 3-year-old Ontario dried and ground ginseng root provided by Chai-Na-Ta Corp., Langley, Canada) at 40, 20, 10, or 0 min before a 25-g oral glucose challenge (Vuksan et al., 2001a). A minimum of 3 days separated each visit to minimize carryover effects. Capillary blood was collected before administration and at 0, 15, 30, 45, 60, and 90 min after the start of the glucose challenge. Postprandial glycemia was lower over the last 45 min of the test after doses of 1, 2, or 3 g ginseng than after placebo ($P < 0.05$); there were no significant differences between doses. The reductions in the areas under the curve for these 3 doses were 14.4 % \pm 6.5 %, 10.6 % \pm 4.0 %, and 9.1 % \pm 6 %, respectively. Glycemia in the last hour of the test and area under the curve were significantly lower when ginseng was administered 40 min before the challenge than when it was administered 20, 10, or 0 min before the challenge ($P < 0.05$). The authors conclude that American ginseng reduced postprandial glycemia in subjects without diabetes. These reductions were time dependent but not dose dependent: an effect was seen only when the ginseng was administered 40 min before the challenge. Doses within the range of 1-3 g were equally effective.

In a review from 2001 by the same Canadian group, a long-term study that apparently has only been published as an abstract (American Diabetes Association Annual Meeting, Diabetes Suppl (1) A95, Abstract No. 384, 2000), is summarized (Vuksan et al., 2001b). In this study 24 well-controlled type 2 diabetic subjects were randomized to consume 1 g of a standardized American ginseng extract (*Panax quinquefolius* L. CNT 2000 produced by Chai-Na-Tai Corp., Langley, BC, Canada) or placebo before each meal three times daily for 8 weeks while following Canadian Diabetes Association diet. 17 of the subjects maintained antidiabetic pharmacological treatment and 15 of the subjects maintained antihypertensive pharmacological treatment. Eight weeks of ginseng treatment modestly but significantly reduced HbA_{1c}, significantly decreased fasting blood glucose ($P < 0.027$), nonsignificantly increased insulin levels and significantly decreased blood pressure compared to placebo treatment. It was concluded that American ginseng extract added to the conventional treatment of diabetes significantly improved glycaemic and blood pressure control beyond conventional treatment alone. Furthermore is a mechanism of action underlying American ginsengs hypoglycemic action proposed to be an enhancement of insulin secretion (Vuksan et al., 2001b).

Another study by the Canadian group was using a randomized, single-blind design. 12 healthy subjects (six males and six females) received 6 g American ginseng (*Panax*

quinquefolius L. provided by Chai-Na-Ta Corp., BC, Canada) or placebo 40 min before a 75 g oral glucose tolerance test (Sievenpiper et al., 2003a). The protocol followed the guidelines for the oral glucose tolerance test, with venous blood samples drawn at -40, 0, 15, 30, 45, 60, 90 and 120 min. Ginsenosides in the ginseng were assessed by established methods for HPLC-UV. Repeated measures analysis of variance demonstrated that there was no significant effect of the ginseng on incremental plasma glucose (PG) or insulin (PI) or their areas under the curve. Indices of insulin sensitivity and release calculated from the oral glucose tolerance test were also unaffected. The ginseng contained 1.66% total ginsenosides, 0.90 % (20S)-protopanaxadiol (PPD) ginsenosides, and 0.75 % (20S)-protopanaxatriol (PPT) ginsenosides, with the following key ratios: PPD:PPT of 1.2, Rb(1):Rg(1) of 8.1, and Rb(2):Rc of 0.18. It was concluded that the used batch of ginseng was unable to reproduce the postprandial hypoglycemic effects that had been observed by the group previously. Possible explanations for this discrepancy was stated to be decrements in total ginsenosides and the key ratios PPD:PPT, Rb(1):Rg(1), and Rb(2):Rc. The authors conclude that the data suggest that the ginsenoside profile of American ginseng might play a role in its hypoglycemic effects, but that the involvement of other components cannot be excluded. It should be noted that opposed to previous studies conducted by this group, the oral glucose tolerance test used persist of 75 g glucose compared to 25 g used earlier.

The aim of one more study was to investigate whether *Panax ginseng* C.A. Meyer (three-year-old powdered whole root from Korean Ministry of Agriculture and Forestry, Seoul South Korea) was able to replicate the glycemia-lowering efficacy reported earlier for a batch of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) (Sievenpiper et al., 2003b). Two separate acute dose escalation studies were performed. Each study was conducted in a separate sample of 11 healthy subjects using a randomized, single-blind, placebo-controlled, multiple-crossover design. Treatments consisted of 0 (placebo), 1, 2, and 3 g of *P. ginseng* for the first study and 0 (placebo), 3, 6, and 9 g *P. ginseng* for the second study administered 40 minutes before a 75 g oral glucose tolerance test protocol with blood drawn at -40, 0, 15, 30, 45, 60, 90, and 120 minutes. A minimum of three days separated each visit to minimize carry-over effects. Ginsenoside content was analyzed by HPLC-UV. Neither the main effect of pooled-treatment, nor dose, nor either factors interaction with time was significant for incremental plasma glucose and insulin. But the diagnostically and therapeutically relevant two-hour plasma glucose value was significantly higher for pooled *P. ginseng* treatment than placebo (5.46 +/- 0.31 versus 4.99 +/- 0.30 mmol/L, $P = 0.050$). Ginsenoside analyses showed that the *P. ginseng* contained up to 96 % lower and sevenfold higher quantities of various ginsenosides and their ratios than the previous efficacious batch of American ginseng. It was concluded that *P. ginseng* showed both null and opposing effects on indices of acute postprandial plasma glucose and insulin. This was in contrast to previous findings with American ginseng. One explanation may be the marked ginsenoside differences. Also in this study a 75 g oral glucose tolerance test was used but it was noted in the discussion that 6 g of the original batch of American ginseng lowered the plasma glucose response to a 75 g oral glucose tolerance test significantly ($P < 0.05$) in 8 nondiabetic subjects, but published data from the study (presumably from 1991) could not be found.

The aim of yet another study by the Canadian group was to assess the effect of eight popular ginseng types on postprandial plasma glucose (PG) and insulin (PI) indices and to link the possible effects to ginsenoside profiles. Using a double-blind, randomized, multiple-crossover design, 12 healthy participants (6 females and 6 males) received a total of ten 3 g treatments, consisting of: American (*Panax quinquefolius* L.), American-wild (wild *Panax quinquefolius* L.), Korean (*Panax ginseng* C.A. Meyer), Korean-red (steam treated *Panax ginseng* C.A. Meyer), Vietnamese-wild (*Panax vietnemensis*), Siberian (*Eleutherococcus senticosus*), Japanese-rhizome (*Panax japonicus* C.A. Meyer), and Sanchi (*Panax notoginseng* [Burk.] F.H. Chen) ginsengs and two placebos (Sievenpiper et al., 2004). Each treatment was given 40-minutes before a 75 g oral glucose tolerance test with blood drawn at -40, 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120-minutes. HPLC-UV analysis quantified seven principal ginsenosides. Comparisons with placebo showed a tendency for American ginseng and Vietnamese ginseng to lower 90-min-PG ($P < 0.06$), while Korean ginseng raised peak-PG and AUC-PG, American-wild ginseng raised 120-min-PG, and Siberian ginseng raised 90-min-PG, 120-min-PG, and AUC-PG ($P < 0.05$). The different glycemic effects of the different types of ginseng could however not be predicted wholly by differences in their seven principal ginsenosides. Other unmeasured ginsenosides or non-ginsenoside components may as well have been involved.

Lung infections

The major cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis patients is chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. Rat and mouse models of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection mimicking that in patients with cystic fibrosis, treated with *Panax ginseng* C.A. Meyer (Song et al., 1997; Song et al., 1998; Song et al., 2002; Song et al., 2003) have shown significantly milder lung pathology and modulations of the immune system, which may favor faster clearance of the bacterial infection compared to saline treated control groups.

Only one publication of the ability of American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) to prevent acute respiratory illness (ARI) in institutional settings including a nursing home and assisted living at three sites, has been found (McElhaney et al., 2004). It describes two randomized, double-blind, placebo-controlled trials conducted late in the 2000 (8 week) and 2000-2001 (12 week) influenza seasons. The participants were eighty-nine (2000) and 109 (2000-2001) subjects, average age 81 and 83.5, respectively; 74 % women. Approximately 90 % had received influenza vaccine. Ginseng extract (CVT-E002), 200 mg or placebo was administered orally twice a day. Acute respiratory illness was defined as two new respiratory symptoms or one with a constitutional symptom. Confirmation of viral acute respiratory illness was done by culture (influenza or respiratory syncytial virus (RSV)) or serology for influenza. An intent-to-treat analysis of pooled data corrected for drug exposure time showed that the incidence of laboratory-confirmed influenza illness (LCII) was greater in placebo- (7 cases/101 subjects) than ginseng-treated (1/97) groups (odds ratio (OR)=7.73, $P=0.033$). Combined data for LCII and RSV illness were also greater in placebo- (9/101) than ginseng-treated (1/97) groups (OR=10.50, $P=0.009$). An overall 89 % relative risk reduction of acute

respiratory illness in the ginseng treated groups was found. A bias in these studies could be that 90 % had received influenza vaccine.

Cancer

A prospective cohort study was conducted in Kangwha-eup from August 1987 to December 1992 to evaluate the preventive effect of ginseng against cancer on a population residing in a ginseng cultivation area (Yun and Choi, 1998). 4634 people over 40 years of age, who completed a questionnaire on ginseng intake, were included. In an attempt to obtain detailed information about ginseng intake, they were asked to specify their age at initial intake, frequency and duration of ginseng intake, the kind of ginseng, etc. Multiple logistic regression was used to estimate relative risks (RR) when controlling simultaneously for covariates. Ginseng consumers had a decreased risk (RR = 0.40, 95 % confidence interval [CI]: 0.28-0.56) for developing cancer compared with non-consumers. On the type of ginseng, the RR was 0.31 (95 % CI: 0.13-0.74) for fresh ginseng extract consumers and 0.34 (95 % CI: 0.20-0.53) for consumers of multiple combinations. There was no cancer death among 24 red ginseng consumers. There was a decreased risk with a rise in the frequency of ginseng intake, showing a dose-response relationship. The RR of ginseng consumers were 0.33 (95 % CI: 0.18-0.57) in gastric cancer and 0.30 (95 % CI: 0.14-0.65) in lung cancer. Among ginseng preparations, fresh ginseng extract consumers were significantly associated with a decreased risk of gastric cancer (RR = 0.33, 95 % CI: 0.12-0.88). The authors conclude that the results strongly suggest that *Panax ginseng* C.A. Meyer has non-organ specific preventive effect against cancer.

In a randomized, placebo-controlled clinical trial red ginseng powder from *Panax ginseng* C.A. Meyer was shown to inhibit the recurrence of stage III gastric cancer and to show immunomodulatory activities during postoperative chemotherapy, after a curative resection with D2 lymph node dissection (Suh et al., 2002). 42 patients were randomized to take 4.5 g ginseng per day or matched placebo during the first six months after operation. Flow cytometric analyses for peripheral T-lymphocyte subsets showed that ginseng restored CD4 levels to the initial preoperative values during postoperative chemotherapy. Depression of CD3 during postoperative chemotherapy was also inhibited by ginseng ingestion. The study demonstrated a five-year disease free survival and overall survival rate that was significantly higher in patients taking the red ginseng powder during postoperative chemotherapy versus control (68.2 % versus 33.3 %, 76.4 % versus 38.5 %, respectively, $P < 0.05$).

Hypertension

A single-blinded placebo-controlled study aimed to investigate the changes of diurnal blood pressure pattern after 8 weeks of red ginseng medication (4.5 g/day, Ginseng Radix Rubra, Korean Tobacco & Ginseng Corporation, Taejeon, Korea. 1.5 g three times a day) by 24-hour ambulatory blood pressure monitoring (every 30 minutes from 8 A.M. to 8 A.M. the following morning) (Han et al., 1998). 34 subjects were classified to 4 subgroups based on 24 hour ambulatory blood pressure monitoring. Placebo was administered for 4 weeks and red ginseng for the following 8 weeks. 24-hour ambulatory blood pressure monitoring was done 1) before starting the intervention, 2) after 4 weeks of placebo administration and 3) after

further 8 weeks ginseng administration. In 26 subjects with essential hypertension, 24 hour mean systolic blood pressure decreased significantly ($P = 0.03$) while diastolic blood pressure only showed a tendency of decline. The decreases in pressures were observed at daytime (8 A.M.-6 P.M.) and dawn (5 A.M.-7 A.M.). In 8 subjects with white coat hypertension, no significant blood pressure change was observed. The authors suggest that red ginseng might be useful as a relatively safe medication adjuvant to current antihypertensive medications.

The effect of 4.5 g Korean red ginseng per day for approximately 24 months, on vascular endothelial cell dysfunction in patients with hypertension has been investigated in a randomized clinical trial (Sung et al., 2000). Seventeen patients with hypertension were divided into a ginseng-treated (7) and a non-treated (10) group and 10 healthy subjects were included as control group. The ginseng treatment period was approximately 24 months (ranging 21-27 months). To assess the function of the vascular endothelial cell, changes of forearm blood flow to infusion of acetylcholine, sodium nitroprusside and bradykinin in incremental doses, were measured by venous occlusion plethysmography. In the ginseng-treated hypertensive group, forearm blood flows at the highest dose of acetylcholine and bradykinin, were significantly higher than those of the non-treated hypertensive group and were not different from those of the control group. In the case of sodium nitroprusside infusion, no significant differences were observed between the control, non-treated and treated groups. Based on these results it is speculated by the authors that Korean red ginseng can improve the vascular endothelial dysfunction in patients with hypertension through increasing the synthesis of nitric oxide.

Miscellaneous

The efficacy of Korean red ginseng for erectile dysfunction using the International Index of Erectile Function, RigiScan (UroHealth Systems, Laguna Niguel, California), hormonal levels and penile duplex ultrasonography with audiovisual sexual stimulation has also been investigated in a total of 45 patients with clinically diagnosed erectile dysfunction in a randomized, double-blind, placebo controlled, crossover study (8 weeks on treatment, 2 weeks of washout and 8 weeks on treatment) (Hong et al., 2002). The effects of Korean red ginseng and placebo were compared using multiple variables. The ginseng dose was 900 mg 3 times daily. Mean International Index of Erectile Function scores were significantly higher in patients treated with Korean red ginseng than in those who received placebo. Scores on questions 3 (penetration) and 4 (maintenance) were significantly higher in the ginseng than in the placebo group. In response to the global efficacy question 60 % of the patients answered that Korean red ginseng improved erection. Among other variables penile tip rigidity on RigiScan showed significant improvement for ginseng versus placebo. The crossover design allowed each subject to be his own control. Washout period could be too short, which would lead to carryover effects in study courses where treatment consisted of ginseng during the first period; this would reduce the effect observed.

In a clinical study employing eight young male subjects the effects of *Panax ginseng* extract (2 g three times a day for 8 weeks) on lipid metabolism were examined by measuring cholesterol, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) before and after intervention (Kim and Park, 2003). ILWha Co. Ltd., Kyonggi, Korea supplied the ginseng extract and financed the study. Ginseng was extracted with 50% of alcohol and the components were characterized as follows: 2.5 % for R_{b1}, 2.1 % for R_{b2}, 2.6 % for R_c, 1.1 % for R_d, 1.2 % for R_e, 0.4 % for R_{g1}, 35 for H₂O, 7% for protein, 0.3% for lipid, 3.5% for ash, 35 % for sugar, 0.5 % for amino acid, 0.2 % for vitamin and 4 % for others. Serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein (LDL) and plasma MDA levels were decreased by administration of ginseng, however high density lipoprotein (HDL) was increased. Those results suggest that a possible hypolipidemic effect of ginseng could be associated with a decrease in TC, TG, LDL, MDA levels and an increase in HDL. Administration of ginseng increased SOD and CAT activities. It should be noted that the used sample size (8) was very small and that the study not was placebo-controlled and blinded.

Drug interactions and effects on enzymes

In an *in vitro* study the effect of a standardized *Panax ginseng* extract (G115), a standardized *Panax quinquefolius* (or North American ginseng) extract (NAGE), and individual ginsenosides (Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, and Rg1) on CYP1 catalytic activities, was assessed by measuring 7-ethoxyresorufin O-dealkylation (Chang et al., 2002). G115 and NAGE decreased human recombinant CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 activities in a concentration-dependent manner. A striking finding was that NAGE was 45-fold more potent than G115 in inhibiting CYP1A2. Compared with G115, NAGE also preferentially inhibited 7-ethoxyresorufin O-dealkylation activity in human liver microsomes. Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re, Rf, and Rg1, either individually or as a mixture and at the levels reflecting those found in an inhibitory concentration (100 g/ml) of NAGE or G115, did not influence CYP1 activities. However, at a higher single ginsenoside concentration (50 g/ml), Rb1, Rb2, Rc, Rd, and Rf inhibited these activities.

To investigate the possible effect of ginseng on the urinary excretion of the 6-beta-hydroxycortisol/cortisol ratio as a marker of cytochrome P450 (CYP) 3A enzyme induction, twenty subjects received *Panax ginseng* 100 mg standardized to 4% ginsenosides twice daily for 14 days (Anderson et al., 2003). *Panax ginseng* did not significantly alter the urinary 6-beta-OH-cortisol/cortisol ratio, suggesting that unlike St. John's wort, *P. ginseng* is not a CYP3A inducer.

In another *in vitro* study, ginsenoside Rb1, Rb2, Rc, and Rd (from Idofine Chemical Co. Sommerville, NJ) at various concentrations (0.1, 1, 10, 100, 200 mol/L) were investigated for their inhibitory effects on hepatic CYP2C9 and CYP3A4 catalytic activities in human liver microsomes (He and Edeki, 2004). Tolbutamide 4-methylhydroxylation and testosterone 6-beta-hydroxylation were used as index reactions of CYP2C9 or CYP3A4 catalytic activities, respectively. The metabolites of both reactions were measured by high-performance liquid

chromatography and used as indicators of whether enzymes were inhibited or unaffected by these agents. Ginsenoside Rd had significant inhibitory potency on both CYP2C9- and CYP3A4-mediated index reactions with IC(50) values of 105 and 62 mol/L, respectively. Ginsenosides Rb1, Rb2, and Rc had limited inhibitory activities on both enzyme reaction systems. It is concluded by the authors that ginsenoside Rd have the potential to interact with conventional medicines that are metabolized by CYP2C9 and CYP3A4 *in vivo*.

P-glycoprotein (Pgp) is a 170 kDa phosphorylated glycoprotein encoded by human MDR1 gene. It is responsible for the systemic disposition of numerous structurally and pharmacologically unrelated lipophilic and amphipathic drugs, carcinogens, toxins, and other xenobiotics in many organs, such as the intestine, liver, kidney, and brain. By using an ATPase assay, purified Pgp protein or intact Pgp-expressing cells, and proper probe substrates, several ginsenosides have been found to be inhibitors of Pgp (Zhou et al., 2004). The inhibition of Pgp activity by these constituents of different ginseng species could result in altered absorption and bioavailability of drugs that are Pgp substrates.

To evaluate the interactions between American ginseng and warfarin, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial has been performed (Yuan et al., 2004). In a 4-week study, 20 young, healthy volunteers received warfarin for 3 days during weeks 1 and 4. Beginning in week 2, subjects were assigned to receive either American ginseng (*Panax quinquefolius*, 0.5 g powdered ground root. Using HPLC total ginsenoside content was 5.19 %; Rb1 1.93 %; Rb2 0.2 %; Rc 0.61 %; Rd 0.42 %; Re 1.68 %; Rg1 0.35 %) or placebo. The peak International normalized ratio (prothrombin time test-control ratio) statistically significantly decreased after 2 weeks of ginseng administration compared with placebo (difference between ginseng and placebo, -0.19 [95 % CI, -0.36 to -0.07]; *P* = 0.0012). The International normalized ratio area under the curve (AUC), peak plasma warfarin level, and warfarin AUC were also statistically significantly reduced in the ginseng group as compared with the placebo group. Peak International normalized ratio and peak plasma warfarin level were positively correlated. The authors conclude that American ginseng reduces the anticoagulant effect of warfarin. And when prescribing warfarin, physicians should ask patients about ginseng use.

The aim of another study was to investigate the effect of St John's wort and ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin (Jiang et al., 2004). Warfarin is a racemic mixture of the R- and S-enantiomers. Most of the anticoagulant activity of warfarin is attributable to S-warfarin but the activity is as well influenced by the hepatic levels of vitamin K. CYP2C9 is the principal enzyme responsible for S-warfarin metabolism. The ginseng used in the study was the brand Golden Glow (Korean ginseng, each capsule containing extract equivalent to 0.5 g *Panax ginseng* root and 8.93 mg ginsenosides as ginsenoside Rg1). It was an open-label, three-way randomized crossover study in 12 healthy male subjects, who received a single 25-mg dose of warfarin alone or after 14 days pretreatment with St John's wort, or 7 days pretreatment with ginseng. Dosing with St John's wort or ginseng was continued for 7 days after administration of the warfarin dose. Platelet aggregation, international normalized ratio (INR) of prothrombin time, warfarin enantiomer

protein binding, warfarin enantiomer concentrations in plasma and S-7-hydroxywarfarin concentration in urine were measured. INR and platelet aggregation were not affected by treatment with St John's wort or ginseng. The apparent clearances of S-warfarin after warfarin alone or with St John's wort or ginseng were, respectively, 198 +/- 38 ml h⁻¹, 270 +/- 44 ml h⁻¹ and 220 +/- 29 ml h⁻¹. The respective apparent clearances of R-warfarin were 110 +/- 25 ml h⁻¹, 142 +/- 29 ml h⁻¹ and 119 +/- 20 ml h⁻¹. St John's wort and ginseng did not affect the apparent volumes of distribution or protein binding of warfarin enantiomers. The authors conclude that St John's wort significantly induced the apparent clearance of both S-warfarin and R-warfarin, which in turn resulted in a significant reduction in the pharmacological effect of rac-warfarin. Coadministration of warfarin with ginseng did not affect the pharmacokinetics or pharmacodynamics of either S-warfarin or R-warfarin (Jiang et al., 2004).

Conclusions and possible future research areas

A total of 35 clinical studies were reviewed. Of these 23 studies showed a positive effect (or not a negative effect e.g. induction or interaction) of ginseng (*Panax* species) on one or more of the measured effect parameters and 12 studies showed no significant effect (or did show an ability to interact with warfarin). The design of the studies was of very different quality but most of them were randomized, placebo-controlled and blinded, and a few were cohort studies.

Eight studies investigating the possible effects of ginseng on cognitive performance and mood were included. Three studies showed improvement of cognitive performance tests, particularly improved accuracy and speed but with no effects on mood after a single dose of 400 or 200 mg G115, standardized ginseng extract. One study reported improved general health after G115 supplement twice daily for 12 weeks. One study showed improvement of health-related-quality of life after 4 weeks treatment with 200 mg G115 per day but after 8 weeks of treatment no significant difference compared to placebo was observed. Three studies showed no significant effects of long term ginseng supplement on memory tests or mood.

Five studies of the possible effects of *Panax ginseng* (three using G115) on physical performance was included. Only one of these showed positive effects of 100 mg G115 twice daily for three months, on several lung function tests in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

Two of three studies showed positive effects of ginseng supplement in women with menopausal symptoms.

Eight studies performed by a group of Canadian researchers, aimed to investigate the possible glucose lowering effect of ginseng. Six of these yielded positive results in favour of American ginseng (*Panax quinquefolius L.*) compared with placebo. Generally the positive effects observed were lower plasma glucose levels after a glucose challenge test in both healthy subjects and type 2 diabetic patients after a single dose of American ginseng. The opposite

effect on plasma glucose were actually seen in one study after a single dose of *P. ginseng* and a specific batch of American ginseng did not have glucose lowering effect probably because of a lower or altered ginsenoside profile. One of the studies was a long-term study (8 weeks) and this study also found lower fasting blood glucose and reduced HbA_{1c} in type 2 diabetic patients after intake of American ginseng compared to intake of placebo before each meal.

Furthermore has two clinical studies shown reduced risk of acute respiratory illness during treatment with American ginseng, a cohort study has shown reduced risk of cancer when taking ginseng supplement and one randomized study has shown improved recovery after gastric cancer operation after ginseng treatment compared with placebo treatment. Treatment with Korean red ginseng has in two studies shown positive effects on blood pressure and endothelial function in hypertensive patients. Korean red ginseng has also been found to have positive effects on male sexual dysfunction. And one study has indicated that *Panax ginseng* has positive effects on lipid metabolism.

In vitro studies have indicated that some ginsenosides may inhibit CYP2C9 and CYP3A4 and P-glycoprotein, and a clinical study has not found that ginseng treatment lead to an induction of CYP3A4. One clinical study has shown interaction of American ginseng (*Panax quinquefolius*) with warfarin but another clinical study using *Panax ginseng* has not found interaction with warfarin.

This summary of areas in which positive effects of ginseng have been obtained, indicate that an obvious future research area is the use of American ginseng in the treatment of type 2 diabetes. It can be speculated that ginseng supplement could reduce the need for other diabetic medicines and postpone the point where insulin therapy is required in type 2 diabetic patients. Other possible areas where positive effects could be expected are cancer, lung infections and perhaps hypertension. It is very difficult to conclude about the effects of ginseng on cognitive functions because these functions are a bit more difficult to measure exactly, but several studies does indicate improved test scores and general health after ginseng treatment. But in all of the areas further studies are still needed to evaluate the possible positive effects of ginseng.

References

- Allen,J.D., McLung,J., Nelson,A.G., and Welsch,M. (1998). Ginseng supplementation does not enhance healthy young adults' peak aerobic exercise performance. J. Am. Coll. Nutr. **17**, 462-466.
- Anderson,G.D., Rosito,G., Mohustsy,M.A., and Elmer,G.W. (2003). Drug interaction potential of soy extract and Panax ginseng. J. Clin. Pharmacol. **43**, 643-648.

- Bahrke, M.S. and Morgan, W.P. (2000). Evaluation of the ergogenic properties of ginseng. *Sports Med.* **29**, 113-133.
- Cardinal, B.J. and Engels, H.J. (2001). Ginseng does not enhance psychological well-being in healthy, young adults: results of a double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *J. Am. Diet. Assoc.* **101**, 655-660.
- Chang, T.K., Chen, J., and Benetton, S.A. (2002). In vitro effect of standardized ginseng extracts and individual ginsenosides on the catalytic activity of human CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1. *Drug Metab. Dispos.* **30**, 378-384.
- Cho, J., Park, W., Lee, S., Ahn, W., and Lee, Y. (2004). Ginsenoside-Rb1 from *Panax ginseng* C.A. Meyer activates estrogen receptor- α and - β , independent of ligand binding. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3510-3515.
- Cui, J., Garle, M., Eneroth, P., and Björkhem, I. (1994). What do commercial ginseng preparations contain? *The Lancet* **344**, 134.
- Dey, L., Xie, J.T., Wang, A., Wu, J., Malecar, S.A., and Yuan, C.S. (2003). Anti-hyperglycemic effects of ginseng: comparison between root and berry. *Phytomedicine.* **10**, 600-605.
- Ellis, J.M. and Reddy, P. (2002). Effects of *Panax ginseng* on quality of life. *Ann. Pharmacother.* **36**, 375-379.
- Engels, H.J., Fahlman, M.M., and Wirth, J.C. (2003). Effects of ginseng on secretory IgA, performance, and recovery from interval exercise. *Med. Sci. Sports Exerc.* **35**, 690-696.
- Engels, H.J. and Wirth, J.C. (1997). No ergogenic effects of ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer) during graded maximal aerobic exercise. *J. Am. Diet. Assoc.* **97**, 1110-1115.
- Gaffney, B.T., Hugel, H.M., and Rich, P.A. (2001). The effects of *Eleutherococcus senticosus* and *Panax ginseng* on steroidal hormone indices of stress and lymphocyte subset numbers in endurance athletes. *Life Sci.* **70**, 431-442.
- Gross, D., Shenkman, Z., Bleiberg, B., Dayan, M., Gittelsohn, M., and Efrat, R. (2002). Ginseng improves pulmonary functions and exercise capacity in patients with COPD. *Monaldi. Arch. Chest Dis.* **57**, 242-246.
- Han, K.H., Choe, S.C., Kim, H.S., Sohn, D.W., Nam, K.Y., Oh, B.H., Lee, M.M., Park, Y.B., Choi, Y.S., Seo, J.D., and Lee, Y.W. (1998). Effect of red ginseng on blood pressure in patients with essential hypertension and white coat hypertension. *Am. J. Chin. Med.* **26**, 199-209.

- Hartley,D.E., Elsabagh,S., and File,S.E. (2004). Gincosan (a combination of Ginkgo biloba and Panax ginseng): the effects on mood and cognition of 6 and 12 weeks' treatment in post-menopausal women. *Nutr. Neurosci.* **7**, 325-333.
- He,N. and Edeki,T. (2004). The inhibitory effects of herbal components on CYP2C9 and CYP3A4 catalytic activities in human liver microsomes. *Am. J. Ther.* **11**, 206-212.
- Hong,B., Ji,Y.H., Hong,J.H., Nam,K.Y., and Ahn,T.Y. (2002). A double-blind crossover study evaluating the efficacy of korean red ginseng in patients with erectile dysfunction: a preliminary report. *J. Urol.* **168**, 2070-2073.
- Jiang,X., Williams,K.M., Liauw,W.S., Ammit,A.J., Roufogalis,B.D., Duke,C.C., Day,R.O., and McLachlan,A.J. (2004). Effect of St John's wort and ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **57**, 592-599.
- Kennedy,D.O., Haskell,C.F., Wesnes,K.A., and Scholey,A.B. (2004). Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng* *Pharmacol. Biochem. Behav.* **79**, 401-411.
- Kennedy,D.O., Scholey,A.B., and Wesnes,K.A. (2002). Modulation of cognition and mood following administration of single doses of Ginkgo biloba, ginseng, and a ginkgo/ginseng combination to healthy young adults. *Physiol. Behav.* **75**, 739-751.
- Kim,S.H. and Park,K.S. (2003). Effects of Panax ginseng extract on lipid metabolism in humans. *Pharmacol. Res.* **48**, 511-513.
- Kim,W.Y., Kim,J.M., Han,S.B., Lee,S.K., Kim,N.D., Park,M.K., Kim,C.K., and Park,J.H. (2000). Steaming of ginseng at high temperature enhances biological activity. *J. Nat. Prod.* **63**, 1702-1704.
- McElhaney,J.E., Gravenstein,S., Cole,S.K., Davidson,E., O'neill,D., Petitjean,S., Rumble,B., and Shan,J.J. (2004). A placebo-controlled trial of a proprietary extract of North American ginseng (CVT-E002) to prevent acute respiratory illness in institutionalized older adults. *J. Am. Geriatr. Soc.* **52**, 13-19.
- Nishijo,H., Uwano,T., Zhong,Y.M., and Ono,T. (2004). Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: effects of red ginseng on learning and memory deficits in an animal model of amnesia. *J. Pharmacol. Sci.* **95**, 145-152.

- Persson,J., Bringlov,E., Nilsson,L.G., and Nyberg,L. (2004). The memory-enhancing effects of Ginseng and Ginkgo biloba in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl.)* **172**, 430-434.
- Petkov,V.D., Belcheva,S., and Petkov,V.V. (2003). Behavioral effects of Ginkgo biloba L., Panax ginseng C.A. Mey. and Gincosan. *Am. J. Chin. Med.* **31**, 841-855.
- Scholey,A.B. and Kennedy,D.O. (2002). Acute, dose-dependent cognitive effects of Ginkgo biloba, Panax ginseng and their combination in healthy young volunteers: differential interactions with cognitive demand. *Hum. Psychopharmacol.* **17**, 35-44.
- Shibata,S., Tanaka,O., Soma,K., and et al. (1965). Studies on saponins and sapogenins of ginseng: the structure of panaxatriol. *Tetrahedron Lett* **3**, 207-213.
- Sievenpiper,J.L., Arnason,J.T., Leiter,L.A., and Vuksan,V. (2003b). Null and opposing effects of Asian ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer) on acute glycemia: results of two acute dose escalation studies. *J. Am. Coll. Nutr.* **22**, 524-532.
- Sievenpiper,J.L., Arnason,J.T., Leiter,L.A., and Vuksan,V. (2003a). Variable effects of American ginseng: a batch of American ginseng (*Panax quinquefolius L.*) with a depressed ginsenoside profile does not affect postprandial glycemia. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 243-248.
- Sievenpiper,J.L., Arnason,J.T., Leiter,L.A., and Vuksan,V. (2004). Decreasing, null and increasing effects of eight popular types of ginseng on acute postprandial glycemic indices in healthy humans: the role of ginsenosides. *J. Am. Coll. Nutr.* **23**, 248-258.
- Song,Z., Johansen,H.K., Faber,V., Moser,C., Kharazmi,A., Rygaard,J., and Hoiby,N. (1997). Ginseng treatment reduces bacterial load and lung pathology in chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 961-964.
- Song,Z., Kharazmi,A., Wu,H., Faber,V., Moser,C., Krogh,H.K., Rygaard,J., and Hoiby,N. (1998). Effects of ginseng treatment on neutrophil chemiluminescence and immunoglobulin G subclasses in a rat model of chronic *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **5**, 882-887.
- Song,Z., Moser,C., Wu,H., Faber,V., Kharazmi,A., and Hoiby,N. (2003). Cytokine modulating effect of ginseng treatment in a mouse model of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *J. Cyst. Fibros.* **2**, 112-119.
- Song,Z., Wu,H., Mathee,K., Høibi,N., and Kharazmi,A. (2002). Gerimax ginseng regulates both humoral and cellular immunity during chronic *Pseudomonas aeruginosa* lung infection. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* **8**, 459-466.

- Sotaniemi,E.A., Haapakoski,E., and Rautio,A. (1995). Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care* **18**, 1373-1375.
- Suh,S., Krogh,M., Kim,N.R., Joh,Y.G., and Cho,M.Y. (2002). Effects of Red Ginseng Upon Postoperative Immunity and Survival in Patients with Stage III Gastric Cancer. *American Journal of Chinese Medicine* **30**, 483-494.
- Sung,J., Han,K.H., Zo,J.H., Park,H.J., Kim,C.H., and Oh,B.H. (2000). Effects of red ginseng upon vascular endothelial function in patients with essential hypertension. *Am. J. Chin. Med.* **28**, 205-216.
- Sørensen,H. and Sonne,J. (1996). A double-masked study of the effects of ginseng on cognitive functions. *Current Therapeutic Research* **57**, 959-968.
- Tode,T., Kikuchi,Y., Hirata,J., Kita,T., Nakata,H., and Nagata,I. (1999). Effect of Korean red ginseng on psychological functions in patients with severe climacteric syndromes. *Int. J. Gynaecol. Obstet.* **67**, 174.
- Vogler,B.K., Pittler,M.H., and Ernst,E. (1999). The efficacy of ginseng. A systematic review of randomised clinical trials. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **55**, 567-575.
- Vuksan,V., Sievenpiper,J.L., Koo,V.Y., Francis,T., Beljan-Zdravkovic,U., Xu,Z., and Vidgen,E. (2000b). American ginseng (*Panax quinquefolius* L) reduces postprandial glycemia in nondiabetic subjects and subjects with type 2 diabetes mellitus. *Arch. Intern. Med.* **160**, 1009-1013.
- Vuksan,V., Sievenpiper,J.L., Wong,J., Xu,Z., Beljan-Zdravkovic,U., Arnason,J.T., Assinewe,V., Stavro,M.P., Jenkins,A.L., Leiter,L.A., and Francis,T. (2001a). American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) attenuates postprandial glycemia in a time-dependent but not dose-dependent manner in healthy individuals. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**, 753-758.
- Vuksan,V., Sievenpiper,J.L., Xu,Z., Wong,E.Y., Jenkins,A.L., Beljan-Zdravkovic,U., Leiter,L.A., Josse,R.G., and Stavro,M.P. (2001b). Konjac-Mannan and American ginseng: emerging alternative therapies for type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.* **20**, 370S-380S.
- Vuksan,V., Stavro,M.P., Sievenpiper,J.L., Beljan-Zdravkovic,U., Leiter,L.A., Josse,R.G., and Xu,Z. (2000c). Similar postprandial glycemic reductions with escalation of dose and administration time of American ginseng in type 2 diabetes. *Diabetes Care* **23**, 1221-1226.

- Vuksan,V., Stavro,M.P., Sievenpiper,J.L., Koo,V.Y., Wong,E., Beljan-Zdravkovic,U., Francis,T., Jenkins,A.L., Leiter,L.A., Josse,R.G., and Xu,Z. (2000a). American ginseng improves glycemia in individuals with normal glucose tolerance: effect of dose and time escalation. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**, 738-744.
- Wiklund,I.K., Karlberg,J., and Lund,B. (1994). A double-blind comparison of the effect on quality of life of a combination of vital substances including standardized ginseng G115 and placebo. *Current Therapeutic Research* **55**, 32-42.
- Wiklund,I.K., Mattsson,L.A., Lindgren,R., and Limoni,C. (1999). Effects of a standardized ginseng extract on quality of life and physiological parameters in symptomatic postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled trial. *Swedish Alternative Medicine Group. Int. J. Clin. Pharmacol. Res.* **19**, 89-99.
- Xie,J.T., Aung,H.H., Wu,J.A., Attel,A.S., and Yuan,C.S. (2002). Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in ob/ob mice. *Am. J. Chin. Med.* **30**, 187-194.
- Xie,J.T., Mehendale,S.R., Wang,A., Han,A.H., Wu,J.A., Osinski,J., and Yuan,C.S. (2004a). American ginseng leaf: ginsenoside analysis and hypoglycemic activity. *Pharmacol. Res.* **49**, 113-117.
- Xie,J.T., Wu,J.A., Mehendale,S., Aung,H.H., and Yuan,C.S. (2004b). Anti-hyperglycemic effect of the polysaccharides fraction from American ginseng berry extract in ob/ob mice. *Phytomedicine.* **11**, 182-187.
- Yuan,C.S., Wei,G., Dey,L., Karrison,T., Nahlik,L., Maleckar,S., Kasza,K., Ang-Lee,M., and Moss,J. (2004). Brief communication: American ginseng reduces warfarin's effect in healthy patients: a randomized, controlled Trial. *Ann. Intern. Med.* **141**, 23-27.
- Yun,T.K. and Choi,S.Y. (1998). Non-organ specific cancer prevention of ginseng: a prospective study in Korea. *International Journal of Epidemiology* **27**, 359-364.
- Zhou,S., Lim,L.Y., and Chowbay,B. (2004). Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* , 57-104.

Review of the health promoting effects of ginseng in preclinical studies

Morten Kobaek-Larsen, Biomedical Laboratory, University of Southern Denmark

Correspondence

Morten Kobaek-Larsen, MSc. Ph.D.
Biomedical Laboratory
University of Southern Denmark
Winsloewparken 23
DK-5000 Odense C
Denmark
Phone: +45 65 50 37 22
Fax: +45 65 90 68 21
E-mail: mkobaek@health.sdu.dk

Abstract

Background and Purpose:

The herbal remedies referred to as “ginseng” are derived from the roots of several plants. One of the most commonly used and researched of the ginsengs is *Panax ginseng*, also called Asian or Korean ginseng. The main active components of *Panax ginseng* are ginsenosides, which have been shown to have a variety of health beneficial effects, including anti-inflammatory, antioxidant, and anticancer effects. To study the effect of ginseng in detail, a number of animal models have been developed. The hypothetical ideal animal model should mimic the human disease in terms of morphology, biochemical alterations, and biological behaviour. No existing model replicates the disease as an entity, but available models approximate many of the characteristics of human diseases. So far few comparative evaluations of the effect of ginseng in various animal models have been made.

Conclusion:

Animal studies cannot replace human clinical trials, but they can be used as a pre-screening tool, so that human trials become more directed, with greater chances of success. Which model(s) to choose depends on the goal(s) of the experiment(s). However, experimental design, bioavailability, route of administration, dosage etc. should be considered in the choice of model. The review published here can provide help in selecting the most optimal model(s) for studying the health beneficial effects of ginseng, and in preventing unnecessary duplication of animal experimentation.

Introduction

Ginseng is a slow-growing root herb with an ancient reputation for promoting vitality and longevity. There are three main types: Chinese or Korean (*Panax ginseng*), American (*Panax quinquefolius*), and Siberian (*Eleutherococcus senticosus*). Siberian ginseng is not true ginseng but its effects are similar. Only *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* are discussed in this review.

Panax is one of the most medicinally important genera in the Orient, where almost every species of the genus has been used as a source of medicine. *Panax* species are found in the northern hemisphere from the central Himalayas onward through China, Korea, and Japan to North America.

A decoction of the root of *Panax ginseng* C. A. Meyer has been traditionally used as both a tonic for restoration of strength and a panacea (hence, the genus name *Panax*, meaning all-healing). Ginseng has also been called an "adaptogen," because it bolsters the body's ability to resist physical and mental stress. As such, ginseng may reduce fatigue, and promote physical endurance. Ginseng also works like a tonic, protecting the body against disease. Along with increasing resistance to diabetes, cancer, heart disease, and various infections, the medical literature on ginseng claims that it can improve memory, increase fertility, protect the liver against many toxins, and protect the body from radiation. Furthermore, ginseng has specific effects on the immune, hormonal, cardiovascular, and central nervous systems.

There is growing evidence in the literature, that the fruits/berry of *Panax ginseng* C. A. Meyer, the well-known traditional herbal remedy used in Chinese medicine, possesses an array of interesting pharmacological actions, such as cardioprotection, vasorelaxant, anti-stress, a stimulating activity of the central nervous system with effects on memory, learning and behaviour. The biologically active constituents of ginseng fruits/berry have been studied extensively and various ginsenosides, dammarane-type triterpene oligoglycosides, have been characterized as the principal ingredients.

Some of the health beneficial effects of ginseng are difficult to study in animal models, however, there several well-characterized models of different human diseases e.g. cancer, diabetes, infection and different neurological diseases.

Ginseng is widely available and comes in various forms. Typical recommendations for the powder form range from one-half to one teaspoon per day. A common method is to add one-half a teaspoon of the dried, pulverized root to one cup of boiling water. The dose for this method is two cups per day. Thus the administration of ginseng to the animal models should be considered.

Animal models using ginseng forward essential diseases

Evidence of cancer-preventive effects of ginseng

Using directly acting carcinogens makes it possible to induce cancer in different organs in a variety of animal. When ginseng was tested in animal models, a reduction in cancer incidence and multiplicity at various sites was noted. *Panax ginseng* and its chemical constituents have

been tested for their inhibiting effect on putative carcinogenesis mechanisms (e.g., cell proliferation and apoptosis, immunosurveillance, angiogenesis); in most experiments inhibitory effects were found [Shin et al., 2000].

Skin cancer

It is of interest that oral administration of the extracts of a white ginseng-containing Chinese medicinal prescription, resulted in the suppression of skin tumour promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated CD-1 mice [Nishino et al., 2001].

Lung cancer

Early studies has indicated that red ginseng extract inhibited the induction of lung tumours induced by urethane, 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene (DMBA) and aflatoxin B1 [Yun et al., 1983]. In the present investigation the chemopreventive action of Panax ginseng extract in Swiss albino mice has been evaluated. Lung adenomas were induced by single subcutaneous injection in the subscapular region with 0.02 ml of benzo(a)pyrene (BP) (0.5 mg suspension in 1 % aqueous gelatin) in newborn mice (less than 24 h old). The oral administration of ginseng extract (10 mg/kg body weight) showed significant reduction in number of adenomas and weight of the lungs induced by BP. A significant reduction ($p < 0.001$) in lung adenoma incidence in ginseng-treated mice was observed as compared to the 68.3 \pm 2.96 % lung adenoma incidence in BP-alone group. The inhibition rate was 72.05 \pm 1.36 % in ginseng-treated group with respect to the reference group (BP-alone group). However, tumour multiplicity was observed as 0.91 \pm 0.08 and 0.25 \pm 0.01 in BP alone and BP+ginseng-treated groups respectively. In ginseng-treated group significantly reduced frequencies of chromosomal aberrations and micronuclei induced by BP were observed. These results suggest the chemopreventive action and antimutagenic effect of ginseng in Swiss albino mice induced by BP in newborn mice [Panwar et al., 2005b]

Colon cancer

The modifying effects of dietary administration of ginseng on the induction and development of aberrant crypt foci (ACF) by an indirectly acting carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine (DMH), were investigated in Fischer 344 (F-344) rats. In Experiment 1, starting at six weeks of age, 65 rats were injected with DMH or saline alone once a week for four weeks. Rats were divided into Groups 1 and 2 and fed with diets containing 1% ginseng for five weeks, starting one week before the first dose of DMH. Furthermore, animals were divided into Groups 3 and 4 received which received ginseng eight weeks after DMH treatment; Group 5 served as a carcinogen control group. In Experiment 2, 60 rats were injected with DMH or saline alone four times at one-week intervals. They were also fed diets containing 1% ginseng or the control diet throughout the 30 days of the experiment. In Experiment 1, numbers of foci with at least four crypts were significantly reduced in Group 2 treated with red ginseng during the initiation phase ($p < 0.005$). In Experiment 2, treatment with red ginseng also resulted in a decrease in the total number of DMH-induced ACF accompanied by a reduction in 5-bromo-2'-deoxyuridine labelling indexes in colonic crypts comprising ACF ($p < 0.005$ and $p < 0.05$, respectively). These findings suggest that dietary administration of red ginseng in

combination with DMH suppresses colon carcinogenesis of rats, and the inhibition may be associated, in part, with suppression of cell proliferation in the colonic mucosa [Fukushima et al., 2001; Li et al., 2000].

The effect of a whole herb mixture (ginseng powder) to suppress the formation of aberrant crypt foci (ACF) was investigated in a rat colon cancer model induced by another indirectly acting carcinogen, azoxymethane (AOM). Second, this study examines the effect of these herbal compounds on apoptosis and the mechanisms by which these compounds evoke apoptosis. The results of this study show that diets containing ginseng decreased the number of ACFs by 1.5-fold compared with control. Histological analysis of the colon mucosa revealed that this herbal supplement induced apoptosis. Furthermore, ginseng was region-specific in inducing apoptosis in the tissue. Taken together, the results suggest that these herbal supplements may exert significant and potentially beneficial effects on decreasing the amount of precancerous lesions and inducing apoptosis in the large intestine [Volate et al., 2005].

Ovarian cancer

The chemopreventive action and antimutagenic effects of a standardized Panax Ginseng extract (processed Panax ginseng extract containing a high titre of ginsenoside Rg3 (>3.0 % w/w)) in Swiss albino mice have been evaluated. The oral administration of ginseng extract at 1, 3 and 10 mg/kg body weight at pre, peri and post-initiation phases, showed significant reductions in the number, size and weight of the papillomas. A significant reduction in tumour incidence (71.41 \pm 6.73 %, 72.19 \pm 4.54 % and 70.46 \pm 0.38 % at 1, 3 and 10 mg/kg body weight, respectively) was observed in animals in the ginseng treated group compared with 100 % tumour incidence in the control group. The cumulative number of papillomas during an observation period of 16 weeks was significantly reduced in the ginseng treated group (24 \pm 0.94, 16 \pm 1.41 and 11 \pm 1.41 at 1, 3 and 10 mg/kg body weight, respectively). However, the average latent period was significantly increased from 10.81 \pm 0.1 weeks in the control group to 12.39 \pm 0.28 weeks in the treated group (10 mg/kg body weight). The average tumour weight was recorded as 128.55 \pm 8.48, 116.00 \pm 8.48 and 57.5 \pm 3.29 mg in 1, 3 and 10 mg/kg body weight ginseng treated groups respectively. The maximum decrease in the frequencies of chromosomal aberrations and micronuclei were recorded in the 10 mg/kg body weight ginseng treated group than that of the 1 and 3 mg/kg body weight ginseng treated animals. These results suggest a dose dependent effectiveness of ginseng extract in chemoprevention and antimutagenicity in Swiss albino mice [Panwar et al., 2005a].

Liver cancer

Oral administration of red ginseng extracts (1 % in diet for 40 weeks) resulted in the significant suppression of spontaneous liver tumour formation in C3H/He male mice. Average number of tumours per mouse in control group was 1.06, while that in red ginseng extracts-treated group was 0.33 ($p < 0.05$). Incidence of liver tumour development was also lower in red ginseng extracts-treated group, although the difference from control group was

not statistically significant. Anti-carcinogenic activity of white ginseng extracts, besides red ginseng extracts, was also investigated. The administration of white ginseng extracts was proven to suppress tumour promoter-induced phenomena in vitro and in vivo. It is of interest that oral administration of the extracts of a white ginseng-containing Chinese medicinal prescription, resulted in the suppression of skin tumour promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-initiated CD-1 mice. These results suggest the usefulness of ginseng in the field of cancer prevention [Nishino et al., 2001].

Evidence of anti-diabetic effects

The ginseng root has been used as a tonic remedy, and its antidiabetic activity has been demonstrated as early as 1920s. Although wild ginseng was thought to be superior to cultivated ginseng as far as pharmacological properties were concerned, there have been no prior reports on the antidiabetic effect of wild ginseng.

The antihyperglycemic effects of the total ginsenosides in Chinese ginseng (TGCG), extracted from leaves and the stem, were evaluated in diabetic C57BL/6Job/ob mice. Animals received daily intraperitoneal injections of TGCG (100 and 200 mg/kg) or oral administration (150 and 300 mg/kg) for 12 d. Fasting blood glucose levels and body weight were measured after fasting the animals for 4 h. Peripheral glucose use was also measured using an intraperitoneal glucose tolerance test. In the injection group, a high dose of TGCG (200 mg/kg) significantly lowered the fasting blood glucose levels in ob/ob mice on d 12 (153 ± 16 mg/dL versus 203 ± 9.8 mg/dL, $P < 0.01$, compared to vehicle-treated group). In the oral group, blood glucose decreased notably with a dose of TGCG (300 mg/kg) on d 12 (169.1 ± 12.6 mg/dL versus 211.6 ± 13.8 mg/dL, $P < 0.05$, compared to the vehicle-treated group). Glucose tolerance was also improved markedly in ob/ob mice. Furthermore, a significant reduction in bodyweight ($P < 0.05$) was observed after 12 d of TGCG (300 mg/kg) treatment in mice from the oral group. The results indicated that in a diabetic ob/ob mouse model TGCG was endowed with significant anti-hyperglycemic and anti-obesity properties. Therefore, the total ginsenosides extracted from Chinese ginseng leaves and the stem may have some potential for treating diabetes [Xie et al., 2005].

In another study, the aim was to examine the possible antioxidant activities of wild Panax ginseng leaf extract intake in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats (WGLE). Initial blood glucose levels increased abruptly after streptozotocin injection. After 4 weeks of WGLE supplementation, blood glucose levels were lower in animals fed 40 mg/kg (266 mg/dL) and 200 mg/kg (239 mg/dL) than those in no-WGLE fed diabetic rats (464 mg/dL). The concentration of blood TBARS, which are considered the main products of glucose oxidation in blood, was also lowered by WGLE supplementation. These results indicate that WGLE supplementation is involved in suppressing a sudden increase in blood glucose levels and a consequent decrease in TBARS levels in diabetic rats. TBARS levels in the liver, kidney and spleen of WGLE-fed diabetic groups were also significantly lower than in the control diabetic group indicating that oral administration of WGLE effectively suppresses lipid peroxidation

that occurs in the organs of diabetic rats. Antioxidant activities of WGLE supplementation further extend in suppressing activities of antioxidant related enzymes, such as glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD), in organs of diabetic rats. These results confirm the effectiveness of WGLE supplementation in detoxifying free radicals that are produced excessively in diabetic-induced complications [Jung et al., 2005].

In a third study, the anti-hyperglycemic effects of a polysaccharides fraction from American ginseng berry extract in diabetic ob/ob mice were evaluated. All animals received daily intraperitoneal injections of polysaccharides at 150 mg/kg body wt. (n = 5), polysaccharides at 50 mg/kg body wt. (n = 5), or vehicle (n = 5) for 10 consecutive days. On Day 5, as compared to the vehicle-treated mice (230.5 \pm 13.5 mg/dl, mean \pm S.E), mice from both treated groups showed significantly lower fasting blood glucose levels (187.4 \pm 20.5 mg/dl and 187.4 \pm 17.1 mg/dl), respectively (both $P < 0.05$). On Day 10, compared to the vehicle group (240.1 \pm 12.3 mg/dl), the 50 mg/kg dose group were at 188.4 \pm 12.6 mg/dl ($P < 0.05$), and the 150 mg/kg dose group were normoglycemic (148.8 \pm 17.6 mg/dl, $P < 0.01$). Those ob/ob mice treated with vehicle did not, however, show significant changes in fasting blood glucose levels. Data from the intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) showed that, compared to Day 0, there was a significant improvement in glucose tolerance in animals who received the 50 and 150 mg/kg polysaccharide doses, and the area under the curve (AUC) decreased 15.5% ($P < 0.05$) and 28.2 % ($P < 0.01$), respectively. Interestingly, after cessation of polysaccharide treatment, the fasting blood glucose levels stayed lower, and returned to control concentration on Day 30. The polysaccharides fraction did not seem to affect body weight changes in ob/ob mice. These data suggest that the polysaccharides fraction from American ginseng berry extract has a potential clinical utility in treating diabetic patients [Xie et al., 2004].

The antihyperglycemic effects of American ginseng berry extract could also be investigated in diabetic ob/ob mice. Animals received daily intraperitoneal (IP) injections of the extract 150 mg/kg for 12 days. On days 5 and 12, the extract-treated ob/ob mice had significantly lower fasting blood glucose levels compared to day 0 (both $p < 0.05$). Glucose tolerance improved significantly, which was shown by overall glucose excursion, calculated as area under the curve (AUC) during the two-hour IP glucose tolerance test. The AUC decreased by 31.8 % on day 12 compared to day 0 ($p < 0.01$). In addition, after 12 days of the berry extract treatment, a significant reduction in body weight ($p < 0.01$ compared to day 0) and a significant increase in body temperature ($p < 0.01$ compared to day 0) was noticeable. These results support in vivo antihyperglycemic and antiobese activity of American ginseng berry extract that may prove to be of clinical importance in the prevention and treatment of Type 2 diabetes [Xie et al., 2002].

Investigation of the preventative anti-diabetic and anti-obese effects of wild ginseng ethanol extract (WGEE) was also performed in animal studies. In the preventive experiment, WGEE co-administered with a high fat diet significantly inhibited body weight gain, fasting blood

glucose, triglyceride, and free fatty acid levels in a dose dependent manner. WGEE-treated mice at doses of 250 and 500 mg/kg improved the insulin resistance index by 55 % and 61 % compared to the high fat diet (HFD) control, respectively. Diameters of white and brown adipocytes were also decreased by 62 % and 46 % in the WG500-treated group compared to those in HFD fed control mice. Taken together, WGEE has potential as a preventive agent for type 2 diabetes mellitus (and possibly obesity) and deserves clinical trial in the near future [Yun et al., 2004].

Evidence of antipruritic effects of ginseng

Pruritus (itch) is an unpleasant cutaneous sensation, which provoke the desire to scratch, can be local or widespread, and can be associated with atopic dermatitis, urticaria or systemic disorders (cholestasis or uraemia). Many endogenous chemical agents (amines, proteases, growth factors, neuropeptides, opioids, and cytokines) can act as pruritogens [Hagermark, 1995;Schmelz et al., 1997]. The etiology of atopic dermatitis may be based on IgE-mediated pharmacological processes of a variety of cell populations such as mast cells and basophiles. To evaluate effect of scratching-inhibitory agents, an animal model of this disorder was set up using BALB/c male mice [Inagaki et al., 2000;Inagaki et al., 2002;Kuraishi et al., 1995]. The behavioural experiments were performed according to the method described in detail previously [Sugimoto et al., 1998]. In brief, the skin on the back of the mice were clipped, and pruritogens, like histamine, were applied each mice by intradermal injection. The mice (one animal/cage) were then put back into the same cage, and observed for scratching behaviour recorded by video camera. Scratching of the injected site by the hind paws was counted and compared to untreated sites, such as the ears [Shin and Kim, 2005]. It has been indicated that ginsenosides may be metabolised to compound K in the intestine and absorbed into the blood circulation in both humans and rats [Akao et al., 1998b;Akao et al., 1998a;Tawab et al., 2003]. Therefore, the antipruritic effect of one of the main ginsenoside Rb1 and its metabolite compound K was studied in the scratching mouse model. Ginsenoside Rb1 orally administrated 6 h before the application of scratching agent potently inhibited the scratching behaviour of the animals. However, when ginsenoside Rb1 was orally administrated 1 h before application of the scratching agent, it did not inhibit the scratching behaviour. These results suggest that to obtain the optimal effect of ginsenoside Rb1, it may take a time (6 h) for ginsenoside Rb1 to be metabolised to compound K by the intestinal microflora. Intraperitoneally and orally administration of compound K showed the antipruritic effect within 1 h after application of the scratching agent [Shin and Kim, 2005].

Evidence of antiallergic effects of ginseng

There are great similarities between this model and allergic type I reaction. Ginseng and ginsenosides has also been shown to have antiallergic activities [Choo et al., 2003;Park et al., 2003]. Ginsenosides isolated by silica gel column chromatography and examined their in vitro and in vivo antiallergic effect on rat peritoneal mast cells and on IgE-induced passive cutaneous anaphylaxis (PCA) in mice. The in vitro anti-inflammatory activity of ginsenoside Rh1 (Rh1) in RAW264.7 cells was investigated. Rh1 potently inhibited histamine release from rat peritoneal mast cells and the IgE-mediated PCA reaction in mice. The inhibitory

activity of Rh1 (87 % inhibition at 25 mg/kg) on the PCA reaction was found to be more potent than that of disodium cromoglycate (31 % inhibition at 25 mg/kg); Rh1 was also found to have a membrane-stabilizing action as revealed by differential scanning calorimetry. It also inhibited inducible nitric oxide synthase (iNOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression in RAW 264.7 cells, and the activation of the transcription factor, NF-kappaB, in nuclear fractions. The antiallergic action of Rh1 may originate from its cell membrane-stabilizing and anti-inflammatory activities, and can improve the inflammation caused by allergies [Park et al., 2004].

Evidence effects of ginseng on infections and the immune system

The major problem in cystic fibrosis patients is chronic lung infection with *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). This infection can be modelled in both mice and rats. Female Lewis rats were challenge intra tracheal with 0.1mL (10^9 CFU *P. aeruginosa*) in seaweed alginate beads. Ginseng from the main and side roots of the *Panax ginseng* CA Meyer (Araliaceae) was extracted in 40 % ethanol and dried and ground in the presence of maldextran. Ginseng was resolved in saline and injected subcutaneously at 150 mg/kg body weight once per day. The control group was injected subcutaneously with saline 1 mL/kg body weight once a day. The injections were started on the same day when all animals were challenged with the infection and continued for either 7 days or 21 days.

Evidence effects of ginseng on angiogenesis

Angiogenesis, the development of new blood vessels from pre-existing endothelium, is a dynamic multistep process that involves intricate interactions between endothelial cells, soluble factors and the extracellular matrix. Under normal condition, angiogenesis plays an important role in a wide range of physiological processes such as wound healing and fetal development. However, some disadvantages are connected to the angiogenesis in particular the establishment and prolongation of solid tumours, and in many angiogenetic diseases such as rheumatitis arthritis. Only the pro-angiogenetic effects of different ginsenosides in vitro and in vivo in animal models are discussed here [Huang et al., 2005;Yue et al., 2005]. In vitro studies has focused on human umbilical vein endothelial cells in presence of either a common angiogenesis stimulating agent (bFGF/VEGF) or the ginsenosides Rg1 or Re. It was shown that both Rg1 and Re stimulated the proliferation and migration of HUVEC in vitro as well as stimulate the ability to form a network of tubes in vitro in a dose-dependent manner. Male Wistar rats (n = 30) were implanted subcutaneously with an extracellular matrix consisting of acellular bovine pericardium. The rats were divided into three different treatments: 1) control, 2) bFGF and 3) ginsenoside Re. Each treatment of rats was subdivided into time points when the implanted samples were evaluated: after 1 week or after 1 month (n = 5 each time point). The results of the animal studies suggested that angiogenesis and tissue regeneration were enhanced in rats treated with ginsenoside Re [Huang et al., 2005;Radad et al., 2004].

Evidence effects of ginseng on neurological diseases

Most of the preclinical research on ginseng has been performed in vitro. The ginsenosides Rb1 and Rg1 exhibit partial neurotrophic and neuroprotective actions in dopaminergic cell cultures of OF1/SPF-mice [Radad et al., 2004].

Neurodegeneration can be induced by 3-nitropropionic acid (3-NP) in animal models. Administration of 3-NP model the situation in which there is an interruption in the energy metabolism (by inhibition of succinate dehydrogenase), followed by death of the neurons. This animal model, mimic the neuronal loss in Huntington's disease [Beal et al., 1993; Miller and Zaborszky, 1997]. In one study, ginseng extracts from the roots and from the leaves and stems of American ginseng were used. The ginseng extracts contains the ginsenosides of interest (Rb1, Rb3 and Rd). Different ginseng preparations were produced: 1) total ginsenoside extract from the roots, 2) total ginsenoside extract from the leaves and stems, 3) total Rb ginsenoside extract, 4) isolated Rb1 extract, 5) isolated Rb3 extract and finally, 6) isolated Rd extract. Adult male Sprague-Dawley rats were divided into to groups either receiving 3-NP alone or pre-treatment with ginseng preparations 1 hour before each dose of 3-NP. Both 3-NP and ginseng preparations were administrated intraperitoneally. Behaviour in all groups was recorded daily and the behaviour was graded for 0 to 5: grade 0, normal behaviour; grade 1 general slowness in movement; grade 2, prominent gait abnormality with poor coordination; grade 3, nearly complete hind-limb paralysis; grade 4, complete hind-limb paralysis; and grade 5, recumbency or death. The model exhibit a relatively large mortality and ethical aspects of this model should be considered. The results of this study, demonstrates that some, but not all, components of ginseng have neuroprotective abilities. The neuroprotective activity was particularly marked in the total Rb ginsenoside extract as well as the extract of the individually ginsenosides Rb1, Rb3 and Rd. The Rd1 ginsenoside makes the largest contribution to the overall effectiveness of the particular extract. Also the mortality is reduced in groups receiving the total Rb ginsenoside extract as well as the extract of the individually ginsenosides Rb1, Rb3 and Rd. Pre-treatment of with total ginsenoside from the root or total ginsenosides from the leaves and stems hand no effect on the 3-NP induced motor impairment or mortality. These results suggest that other components in these preparations have opposite, or neutralizing, effects compared with the ginsenosides in the total Rb ginsenoside extract as well as the extract of the individually ginsenosides Rb1, Rb3 and Rd. Also non-ginsenosides, which is most predominantly in the roots, could be considered to neutralise the effects of the ginsenosides [Lian et al., 2005].

Evidence effects of ginseng on psychiatric disorders

Ginseng has also been used traditionally for treatment of psychiatric disorders such as anxiety and depression. It was previously reported that panax ginseng extract stabilized sleeping in food-deprived rats [Lee et al., 1990]. Also ginseng saponins administrated in high doses prolonged the pentobarbital sleeping time and delayed onset of convulsions in behavioural studies. Ginseng induces sedative effects at higher doses and anxiolytic effects at lower doses. The ginsenosides may act through GABAergic transmission mechanism to conduct their anxiolytic activities [Park et al., 2005].

In animal models, the anxiolytic effects were measured by an elevated plus-maze test, described in details [Hogg, 1996;Rodgers and Johnson, 1998]. Briefly, the plus maze apparatus is comprised of two open arms (30 x 5 cm) and two closed arms (30 x 5 x 15 cm) that extend from a common central platform (5 x 5 cm). The apparatus was elevated to a height of 38 cm above the floor level [Pellow and File, 1986]. The level of anxious behaviour was evaluated in three ways: 1) the numbers of entries into the open arms relative to the total entries into both open and closed arms; 2) time spent on the open arms relative to the total time spent in the plus-maze; and 3) measurement of the locomotor activity in an activity cage. Male ICR mice were used for these experiments. The anxiolytic effects of the butanol fraction of ginsenosides of red (steam-processed) and sun (heat-processed) ginseng were analysed in this model and compared to the control drug diazepam (2 mg/kg) as well as the vehicle control. This study indicates that some ginsenosides (Rb1, Rg1, Rg5 and Rk) may be useful for the treatment of anxiety, whereas some ginsenosides (Rg3-R, Rg3-S) do not in this animal model [Cha et al., 2005].

Conclusions

This review has elucidated that extensive studies have been performed on the effect of ginseng in animal models. However, a great variety in ginseng material, animal strains and species has been used, which makes it difficult to evaluate and compare the results. In most cases ginseng extract affects the diseases in these animal models; however, often the purified ginsenosides give rise to different results compared with the crude ginseng extract. This information could be used in the cultivation of ginseng – to cultivate the ginseng in a way that produces the optimal relation between the ginsenosides in the plant. Also the different parts of the plants; leaves, stem, roots and the fruit contain different contents of the different ginsenosides.

Reference List

- Akao T, Kanaoka M, Kobashi K (1998a) Appearance of compound K, a major metabolite of ginsenoside Rb1 by intestinal bacteria, in rat plasma after oral administration-- measurement of compound K by enzyme immunoassay. *Biol Pharm Bull* **21**: 245-249
- Akao T, Kida H, Kanaoka M, Hattori M, Kobashi K (1998b) Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from *Panax ginseng*. *J Pharm Pharmacol* **50**: 1155-1160
- Beal MF, Brouillet E, Jenkins BG, Ferrante RJ, Kowall NW, Miller JM, Storey E, Srivastava R, Rosen BR, Hyman BT (1993) Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. *J Neurosci* **13**: 4181-4192

- Cha HY, Park JH, Hong JT, Yoo HS, Song S, Hwang BY, Eun JS, Oh KW (2005) Anxiolytic-like effects of ginsenosides on the elevated plus-maze model in mice. ***Biol Pharm Bull* 28**: 1621-1625
- Choo MK, Park EK, Han MJ, Kim DH (2003) Antiallergic activity of ginseng and its ginsenosides. ***Planta Med* 69**: 518-522
- Fukushima S, Wanibuchi H, Li W (2001) Inhibition by ginseng of colon carcinogenesis in rats. ***J Korean Med Sci* 16 Suppl**: S75-S80
- Hagermark O (1995) Itch mediators. ***Semin Dermatol* 14**: 271-276
- Hogg S (1996) A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. ***Pharmacol Biochem Behav* 54**: 21-30
- Huang YC, Chen CT, Chen SC, Lai PH, Liang HC, Chang Y, Yu LC, Sung HW (2005) A natural compound (ginsenoside Re) isolated from Panax ginseng as a novel angiogenic agent for tissue regeneration. ***Pharm Res* 22**: 636-646
- Inagaki N, Igeta K, Kim JF, Nagao M, Shiraishi N, Nakamura N, Nagai H (2002) Involvement of unique mechanisms in the induction of scratching behavior in BALB/c mice by compound 48/80. ***Eur J Pharmacol* 448**: 175-183
- Inagaki N, Nagao M, Nakamura N, Kawasaki H, Igeta K, Musoh K, Nagai H (2000) Evaluation of anti-scratch properties of oxatomide and epinastine in mice. ***Eur J Pharmacol* 400**: 73-79
- Jung CH, Seog HM, Choi IW, Choi HD, Cho HY (2005) Effects of wild ginseng (Panax ginseng C.A. Meyer) leaves on lipid peroxidation levels and antioxidant enzyme activities in streptozotocin diabetic rats. ***J Ethnopharmacol* 98**: 245-250
- Kuraishi Y, Nagasawa T, Hayashi K, Satoh M (1995) Scratching behavior induced by pruritogenic but not algesiogenic agents in mice. ***Eur J Pharmacol* 275**: 229-233
- Lee SP, Honda K, Rhee YH, Inoue S (1990) Chronic intake of panax ginseng extract stabilizes sleep and wakefulness in food-deprived rats. ***Neurosci Lett* 111**: 217-221
- Li W, Wanibuchi H, Salim EI, Wei M, Yamamoto S, Nishino H, Fukushima S (2000) Inhibition by ginseng of 1,2-dimethylhydrazine induction of aberrant crypt foci in the rat colon. ***Nutr Cancer* 36**: 66-73
- Lian XY, Zhang Z, Stringer JL (2005) Protective effects of ginseng components in a rodent model of neurodegeneration. ***Ann Neurol* 57**: 642-648

- Miller PJ, Zaborszky L (1997) 3-Nitropropionic acid neurotoxicity: visualization by silver staining and implications for use as an animal model of Huntington's disease. *Exp Neurol* **146**: 212-229
- Nishino H, Tokuda H, Ii T, Takemura M, Kuchide M, Kanazawa M, Mou XY, Bu P, Takayasu J, Onozuka M, Masuda M, Satomi Y, Konoshima T, Kishi N, Baba M, Okada Y, Okuyama T (2001) Cancer chemoprevention by ginseng in mouse liver and other organs. *J Korean Med Sci* **16 Suppl**: S66-S69
- Panwar M, Kumar M, Samarth R, Kumar A (2005a) Evaluation of chemopreventive action and antimutagenic effect of the standardized Panax ginseng extract, EFLA400, in Swiss albino mice. *Phytother Res* **19**: 65-71
- Panwar M, Samarth R, Kumar M, Yoon WJ, Kumar A (2005b) Inhibition of benzo(a)pyrene induced lung adenoma by panax ginseng extract, EFLA400, in Swiss albino mice. *Biol Pharm Bull* **28**: 2063-2067
- Park EK, Choo MK, Han MJ, Kim DH (2004) Ginsenoside Rh1 possesses antiallergic and anti-inflammatory activities. *Int Arch Allergy Immunol* **133**: 113-120
- Park EK, Choo MK, Kim EJ, Han MJ, Kim DH (2003) Antiallergic activity of ginsenoside Rh2. *Biol Pharm Bull* **26**: 1581-1584
- Park JH, Cha HY, Seo JJ, Hong JT, Han K, Oh KW (2005) Anxiolytic-like effects of ginseng in the elevated plus-maze model: comparison of red ginseng and sun ginseng. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **29**: 895-900
- Pellow S, File SE (1986) Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **24**: 525-529
- Radad K, Gille G, Moldzio R, Saito H, Ishige K, Rausch WD (2004) Ginsenosides Rb1 and Rg1 effects on survival and neurite growth of MPP+-affected mesencephalic dopaminergic cells. *J Neural Transm* **111**: 37-45
- Rodgers RJ, Johnson NJ (1998) Behaviorally selective effects of neuroactive steroids on plus-maze anxiety in mice. *Pharmacol Biochem Behav* **59**: 221-232
- Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Handwerker HO, Torebjork HE (1997) Specific C-receptors for itch in human skin. *J Neurosci* **17**: 8003-8008

- Shin HR, Kim JY, Yun TK, Morgan G, Vainio H (2000) The cancer-preventive potential of Panax ginseng: a review of human and experimental evidence. **Cancer Causes Control** 11: 565-576
- Shin YW, Kim DH (2005) Antipruritic effect of ginsenoside rb1 and compound k in scratching behavior mouse models. **J Pharmacol Sci** 99: 83-88
- Sugimoto Y, Umakoshi K, Nojiri N, Kamei C (1998) Effects of histamine H1 receptor antagonists on compound 48/80-induced scratching behavior in mice. **Eur J Pharmacol** 351: 1-5
- Tawab MA, Bahr U, Karas M, Wurglics M, Schubert-Zsilavecz M (2003) Degradation of ginsenosides in humans after oral administration. **Drug Metab Dispos** 31: 1065-1071
- Volate SR, Davenport DM, Muga SJ, Wargovich MJ (2005) Modulation of aberrant crypt foci and apoptosis by dietary herbal supplements (quercetin, curcumin, silymarin, ginseng and rutin). **Carcinogenesis** 26: 1450-1456
- Xie JT, Aung HH, Wu JA, Attel AS, Yuan CS (2002) Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in ob/ob mice. **Am J Chin Med** 30: 187-194
- Xie JT, Wang CZ, Wang AB, Wu J, Basila D, Yuan CS (2005) Antihyperglycemic effects of total ginsenosides from leaves and stem of Panax ginseng. **Acta Pharmacol Sin** 26: 1104-1110
- Xie JT, Wu JA, Mehendale S, Aung HH, Yuan CS (2004) Anti-hyperglycemic effect of the polysaccharides fraction from American ginseng berry extract in ob/ob mice. **Phytomedicine** 11: 182-187
- Yue PY, Wong DY, Ha WY, Fung MC, Mak NK, Yeung HW, Leung HW, Chan K, Liu L, Fan TP, Wong RN (2005) Elucidation of the mechanisms underlying the angiogenic effects of ginsenoside Rg(1) in vivo and in vitro. **Angiogenesis** 8: 205-216
- Yun SN, Moon SJ, Ko SK, Im BO, Chung SH (2004) Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. **Arch Pharm Res** 27: 790-796
- Yun TK, Yun YS, Han IW (1983) Anticarcinogenic effect of long-term oral administration of red ginseng on newborn mice exposed to various chemical carcinogens. **Cancer Detect Prev** 6: 515-525

5. Aktiv-og indholdstoffer- synteseveje i ginseng

Lars Porskjær Christensen

Både i forædling og optimering af dyrkning samt i fremstilling af produkter af ginseng er det afgørende, at have viden om hvordan de biokemiske aktivstoffer dannes og omdannes i planten. Denne viden kan bruges aktivt til, at forbedre og kvalitetssikre produktionen af ginseng fremover.

Da der yderligere ligger væsentlige potentialer for fremtidig fremstilling af specifikke produkter baseret på f.eks. rene ginsenosider eller kemisk/enzymatisk modificering af ginsenosidsammensætningen eller polyacetylsammensætningen, har det været afgørende for projektet, at kunne beskrive viden omkring dannelsen af disse aktivstoffer i planten og deres kemiske forskelle.

Dele af nedenstående beskrivelse blev formidlet mundtligt på ginseng workshopen i juni 2005 (se indlæg af LPC), men bringes her fuldt ud med alle forklaringer. Her er desuden indlagt eksempler på analyser af rødder for aktivstoffer og en nyudviklet metode til simultan analyse af ginsenosider og polyacetylenere.

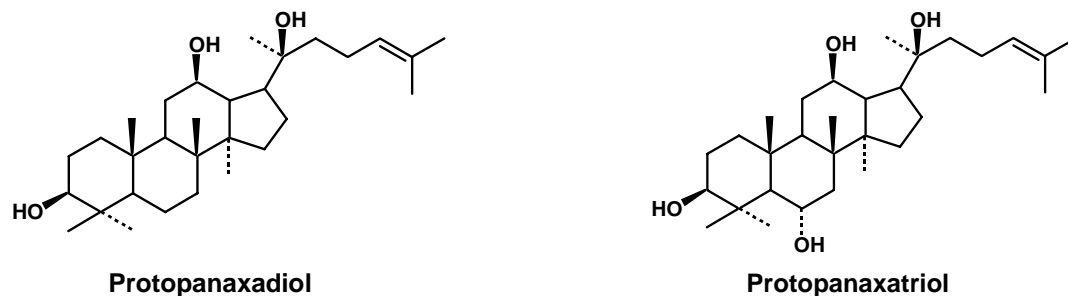
Indledning

Ginsengrødder har været brugt i årtusinder i den traditionelle medicin i Asien og Amerika. Ginsengs helbredende og forebyggende egenskaber bliver ofte forbundet med plantens indhold af ginsenosider (dammaran saponiner) og polyacetylenere - og til dels også polysaccharider. Specielt de ginsengproducerende lande såsom Kina, Korea, Japan og Canada har, via en intensiv forskningsindsats gennem de sidste 20 år, isoleret og identificeret forskellige ginsenosider og polyacetylenere fra planterne og undersøgt stoffernes biologiske og medicinske betydning, herunder også deres biosyntese.

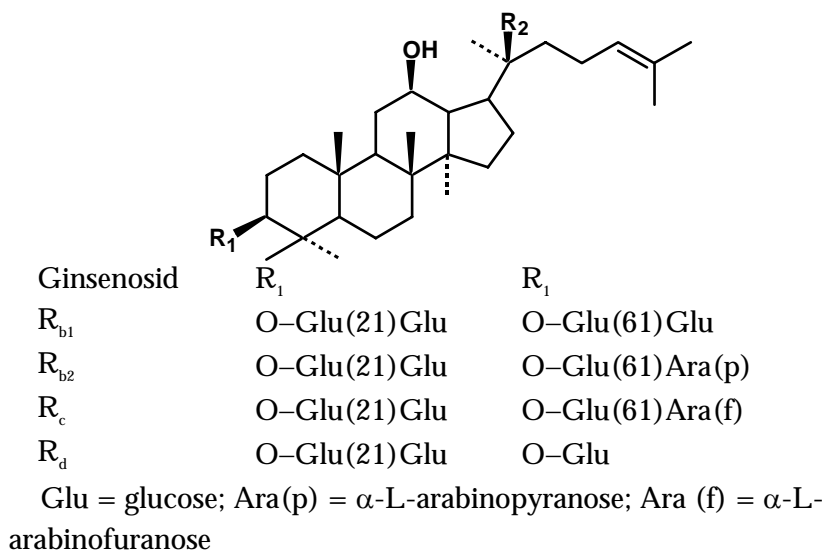
Biosyntese af ginsenosider og polyacetylenere fra Amerikansk ginseng

Biosyntese af ginsenosider

Antallet, typen og mængden af ginsenosider varierer meget indenfor de forskellige ginseng arter men også biotiske faktorer som klima, dyrkningsforhold, sæson etc. spiller en væsentlig rolle for produktionen af ginsenosider og andre bioaktive naturstoffer. Det totale antal af ginsenosider isoleret fra forskellige ginseng arter, er ca. 35, og inkludere også olean-type ginsenosider. De fleste ginsenosider kan inddeles i følgende to grupper efter deres aglyconer: (i) protopanaxadiol-gruppen og (ii) protopanaxatriol-gruppen (Fig. 5.1).

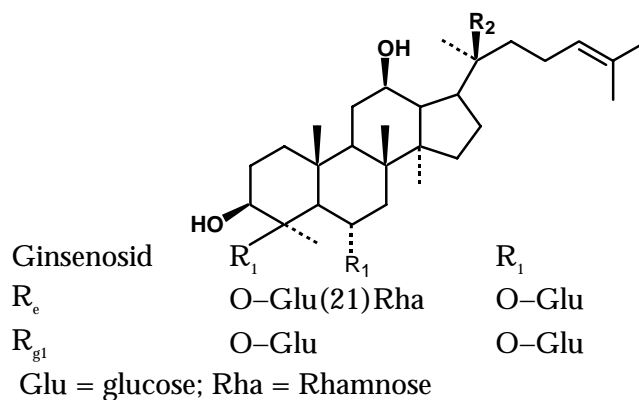


Figur 5.1. De fleste ginsenosider er enten af protopanaxadiol- eller af protopanaxatriol-typen.



Figur 5.2. Ginsenosider af protopanaxadiol-typen fundet i Amerikansk ginseng.

I protopanaxadiol-gruppen finder vi f.eks. R_{b1} , R_{b2} , R_c og R_d (Figur 5.2) og i protopanaxatriol-gruppen f.eks. R_e , R_f , R_{g1} og R_{g2} (Figur 5.3) og deres malonylerede derivater. Disse ginsenosider er med undtagelse af R_f og R_{g2} alle blevet isoleret fra Amerikansk ginseng. Malonylerede ginseno-

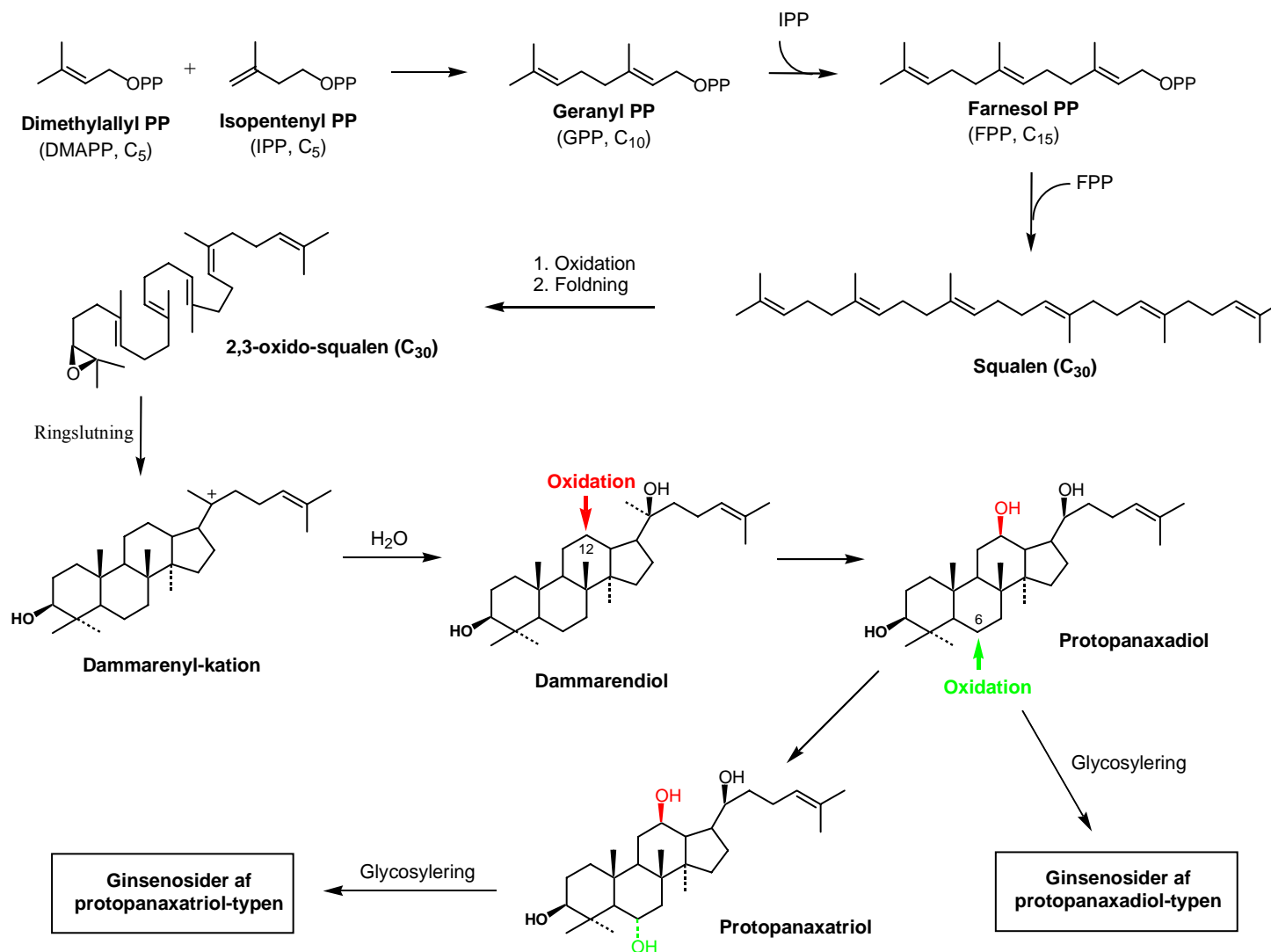


Figur 5.3. Ginsenosider af protopanaxatriol-typen fundet i Amerikansk ginseng.

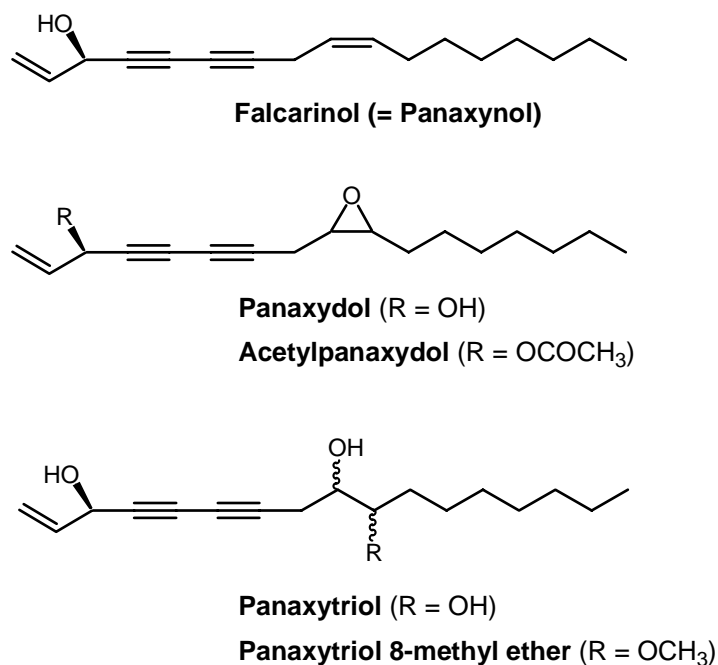
sider optræder dog ikke i alle undersøgelser af Amerikansk ginseng og syntesen af disse synes derfor ikke kun, at være genetisk bestemt men mere af ydre faktorer så som klima, sæson, etc. Når de malonylerede ginsenosider optræder bør de tages med i den totale mængde ginsenosider, idet de meget nemt omdannes til de tilsvarende ikke-malonylerede ginsenosider under forarbejdning af rødderne og/eller når de metaboliseres *in vivo* i kroppen. Der er lavet adskillige videnskabelige undersøgelser af ginsenosidernes biosyntese. Ud fra disse undersøgelser fremgår det, at biosyntesen af ginsenosider foregår via den typiske biosyntesevej for triterpenoider via foldning af den lineære triterpen 2,3-oxido-squalen, efterfulgt af en ringslutning som fører til dammarendiol via en kemisk quenching af dammerenylkation med vand, som illustreret i Figur 5.4. Yderligere oxidation af dammarendiol i position 12 fører til protopanaxadiol, som kan glycosyleres til ginsenosider af protopanaxadiol-typen. Oxidation af protopanaxadiol i 6-positionen efterfulgt af glycosylering fører til ginsenosider af protopanaxatriol-typen (Figur 5.4). Triterpenen squalen er ikke kun precursor for ovenfornævnte ginsenosider men en lang række andre triterpenoider, herunder også olean-type ginsenosider. Biosyntesen af squalen følger den normale biosyntesevej for C_{30} -terpener fra dimethylallyl diphosphat (DMAPP) og isopentenyl diphosphat (IPP), der kommer fra mevalonat (Figur 5.4).

Biosyntese af polyacetylen

Polyacetylen er umættede forbindelser indeholdende to til flere trippelbindinger (= acetylenbindinger) i deres kemiske struktur. Polyacetylen i Araliaceae familien og den nært beslægtede skærmplantefamilie (Apiaceae) er typisk alifatiske C_{17} -polyacetylen. Der er isoleret ca. 35 polyacetylen fra ginseng, herunder er de 7 isoleret fra Amerikansk ginseng hvoraf de vigtigste er vist i Figur 5. De polyacetylen, der normalt forekommer i højest koncentration i Amerikansk ginseng er falcarinol (= panaxynol) og panaxydol. Polyacetylenene fra ginseng er ligesom de fleste andre polyacetylen biosyntetiseret fra umættede fedtsyrer (f.eks. oliesyre og linolsyre) via crepenyinsyre og dehydrocrepenyinsyre som illustreret i Figur 5.6.



Figur 5.4. Biosyntese af ginsenosider af protopanaxadiol- og protopanaxadiol-typen i *Panax quinquefolium*.



Figur 5.5. Bioaktive polyacetylenier isoleret fra Amerikansk ginseng.

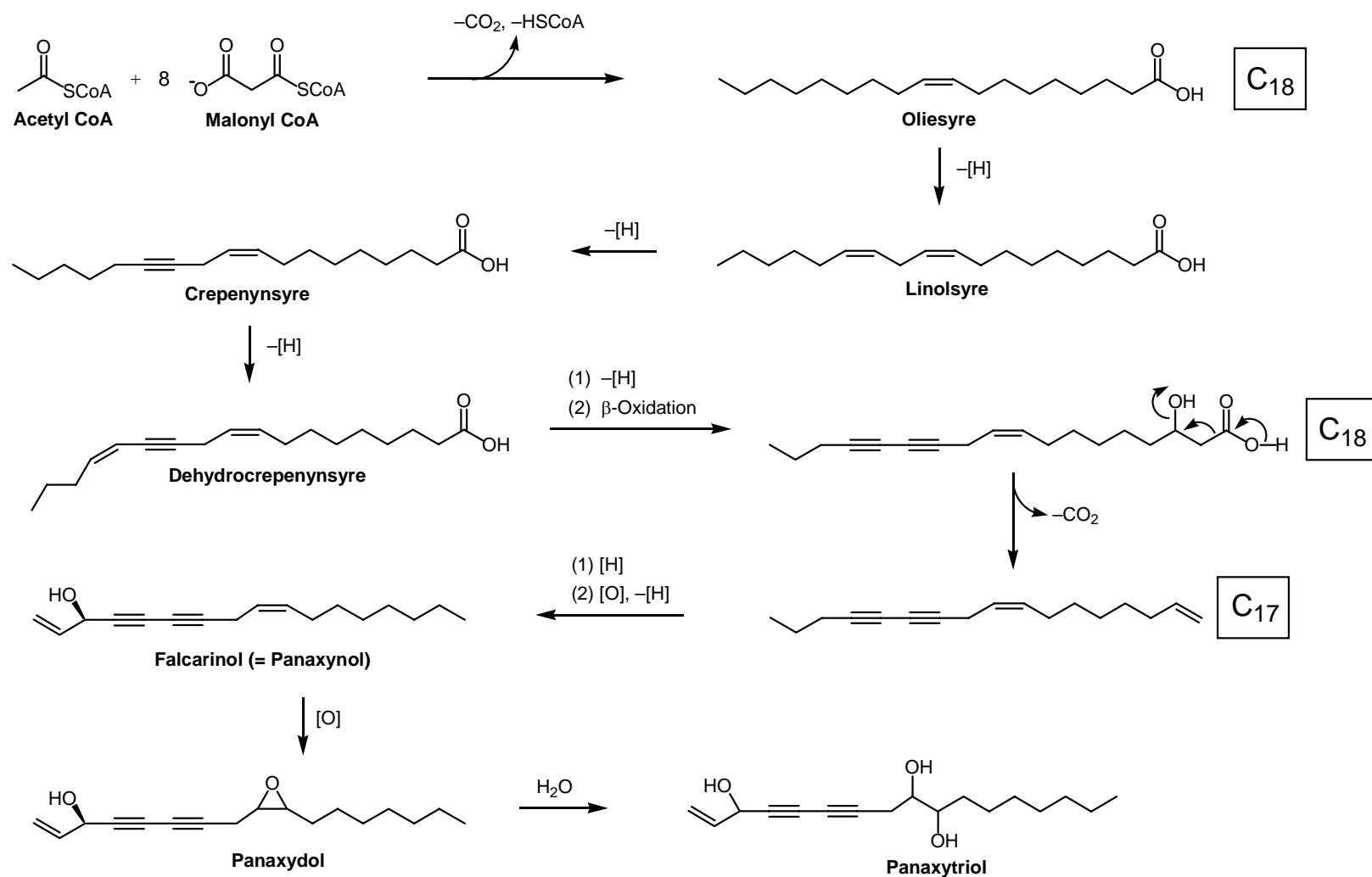
Bioaktive indholdsstoffer i Amerikansk ginseng

Ginsenosid- og polyacetylen profilen varierer mellem de forskellige ginseng arter, hvor det i amerikansk ginseng (***Panax quinquefolium***) er ginsenosidet R_g og ginsenosider af R_g - og R_b -serien (Figur 5.1), samt polyacetylenierne falcarinol og panaxydol (Figur 5.2), der hovedsageligt er ansvarlige for den helbredsgavnige virkning af denne type ginseng. Videnskabelige forskningsresultater har vist, at ginsenosiderne reducerer stress, øger kroppens modstandskraft mod sygdomme (immunstimulerende), formindsker risikoen for blodpropper (bl.a. blodtryksregulerende) og kræft samt har effekt på type 2 diabetes (øger bl.a. insulinproduktionen). For polyacetylenierne vedkommende har man påvist, at disse ligesom ginsenosiderne sandsynligvis har en forebyggende effekt overfor udviklingen af blodpropper (blodtryksregulerende og kolesterolsænkende) og kræft. Ginsenosider og polyacetylenier betragtes derfor i dag som nogle af de centrale aktivstoffer i ginseng, og det er derfor også disse stoffer, man bruger til kvalitetsbestemmelse af ginseng rødder og/eller ginsengpræparater.

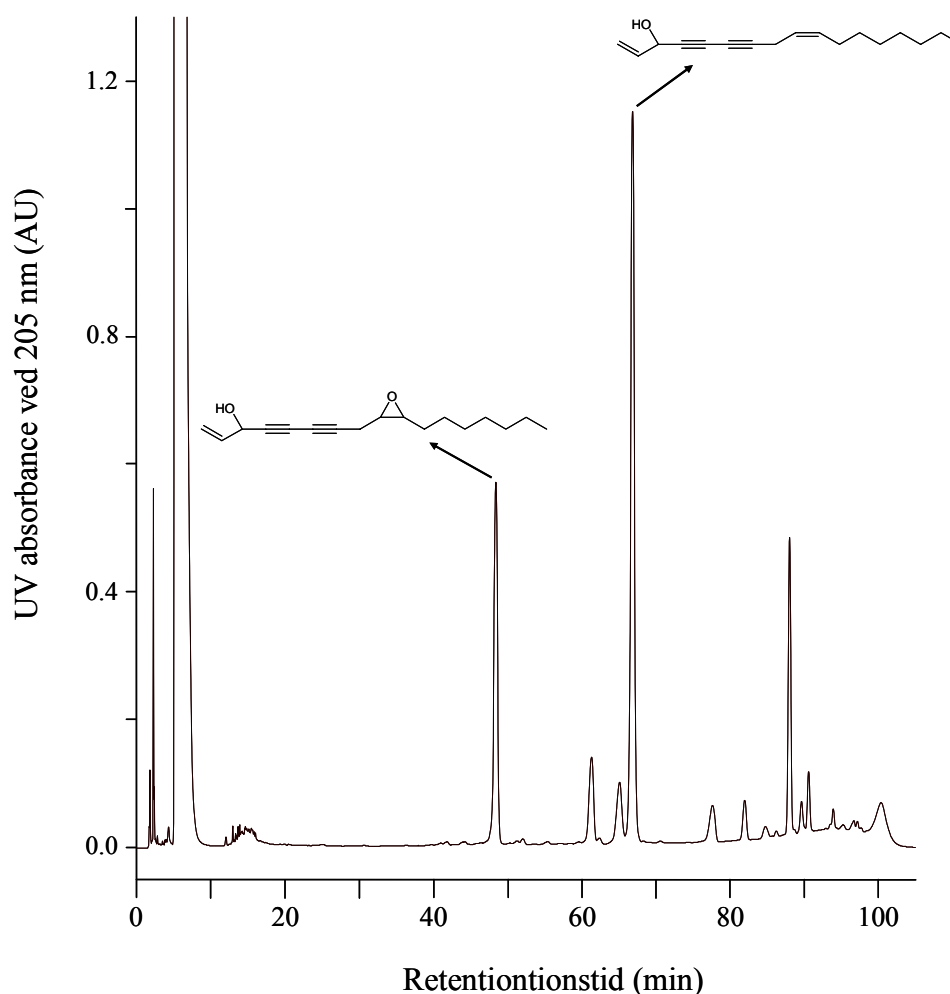
Naturstoffkemisk undersøgelse af Amerikanske ginseng rødder

Kvantificering, isolering og identifikation af polyacetylenere

Undersøgelse af et ethylacetat ekstrakt fra ginseng rødder ved analytisk højtrykssvæskerkromatografi ('High Pressure Liquid Chromatography', HPLC) viste, at de friske rødder overvejende indeholder to polyacetylenere (se Figur 5.7). Polyacetylenere blev efterfølgende isoleret fra et ethylacetat ekstrakt fra 5 kg ginseng rødder ved brug af søjlekromatografi og præparativ HPLC, og analyseret ved spektroskopiske metoder som kerne magnetisk resonans spektroskopi (NMR) og massespektrometri (MS) for, at med sikkerhed at fastslå deres kemiske struktur. Polyacetylenerne blev identificeret som værende hhv. falcarinol og panaxydol (Figur 5.5). De isolerede polyacetylenere blev brugt som eksterne standarder til bestemmelse af deres koncentrationer i forskellige ginseng ekstrakter og til testning for bl.a. antidiabetisk effekt i forskellige bioassays.



Figur 5.6. Biosyntese af nogle af de vigtigste polyacetylenier isoleret fra *Panax quinquefolium*.



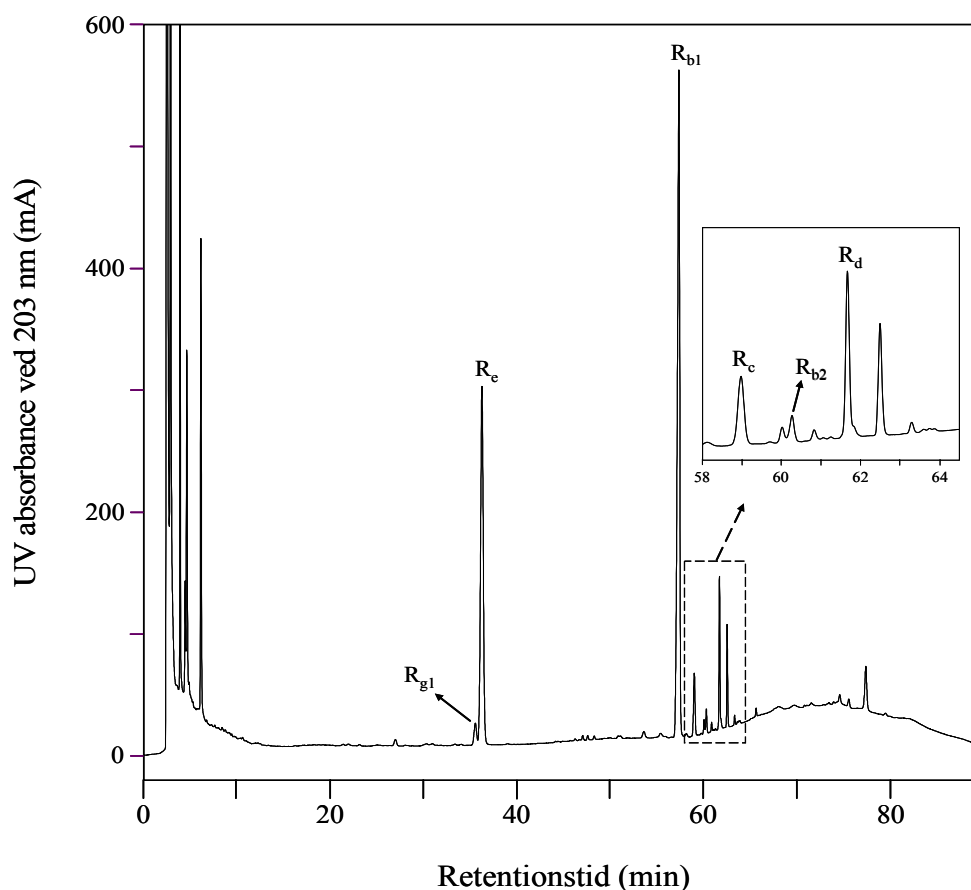
Figur 5.7. Analytisk HPLC kromatogram af et ethylacetat ekstrakt fra en Amerikansk ginsengrød, der viser signaler fra polyacetylerne falcarinol og panaxydol. Polyacetylerne blev adskilt på en Luna 3 C18(2) 100A omvendt-fase kolonne (3 μ m; 150 \times 4.6 mm i.d.) ved 40 $^{\circ}$ C ved at benytte følgende gradient: CH₃CN–H₂O [0–5 min (20:80), 10 min (50:50), 30 min (53:47), 45–50 min (65:35), 70–72 min (75:25), 90–95 min (95:5), 100–110 min (20:80)]. Alle stigninger/fald i gradienten var lineær programmeret. Flow hastighed: 1 ml/min. Injektions-volumen: 20 μ l. Detektion: Diode array detektor, der optog signaler fra 200–600 nm.

Kvantificering, isolering og identifikation af ginsenosider.

Et 80 % methanol ekstrakt fra samme ginseng rødder som blev ekstraheret med ethylacetat (se afsnit 2.1) blev analyseret for indhold af ginsenosider ved analytisk HPLC.

Resultaterne fra HPLC analysen viste, at ekstraktet indeholdt ginsenosiderne R_{b1} , R_{b2} , R_c og R_d (protopanaxadiol-gruppen) og R_e og R_{g1} (protopanaxatriol-gruppen) (Figur 5.8).

Strukturen af de enkelte ginsenosider blev verificeret med autentiske standarder oprenset og/eller indkøbt. Resultaterne er i overensstemmelse med andre undersøgelser af Amerikanske ginseng rødder for ginsenosider. Til gengæld blev der ikke detekteret malonylerede ginsenosider. Da ekstrakterne blev lavet på friske rødder kan det udelukkes, at disse ginsenosider er til stede i de analyserede ginseng rødder. Det må derfor konkluderes, at de analyserede ginseng rødder kun indeholder de såkaldte neutrale ginsenosider.

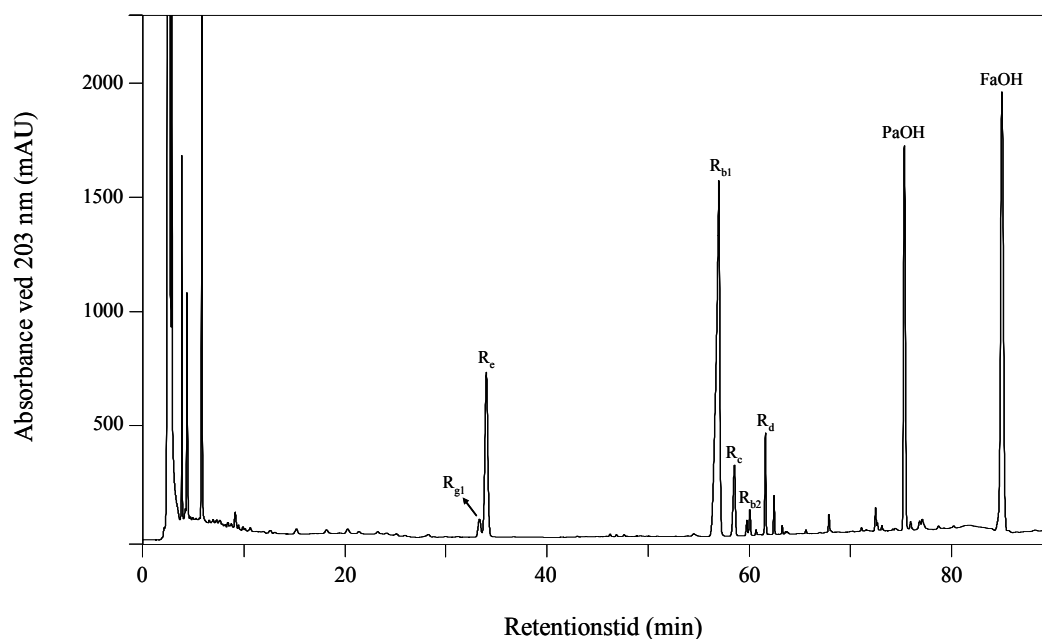


Figur 5.8. Analytisk HPLC kromatogram af et 80 % methanol ekstrakt fra en Amerikansk ginsengrod efter den har været ekstraheret med ethylacetat. Kromatogrammet viser fordelingen af ginsenosider i ekstraktet som blev adskilt på en Purospher STAR RP-18 kolonne (5 μ m; 250 \times 4 mm i.d.) ved 35 $^{\circ}$ C ved at benytte følgende gradient af solvent A (10 % MeCN–90 % H₂O [v/v]) og solvent B (75 % MeCN–25 % H₂O [v/v]): 0 min 0 % B, 5–15 min 15 % B, 26–36 min 25 % B, 36, 45 min 35 % B, 50 min 40 % B, 60–74 min 100 % B, 84–89 min 0 % B. Alle stigninger/ fald i gradienten var lineær programmeret. Flow hastighed: 1 ml/min. Injektionsvolumen: 20 μ l. Detektion: Diode array detektor, der optog signaler fra 200–600 nm.

Ginsenosider tilstede i størst koncentration i ginsengekstraktet dvs. R_{b1} , R_d og R_e blev oprenset ved præparativ HPLC og sendt til testning for bl.a. anti-diabetisk aktivitet i diverse bioassays.

Udvikling af ny analysemetode til simultan ekstraktion og kvantificering af polyacetylen og ginsenosider

På baggrund af resultaterne fra de kvantitative analyser af hhv. ethylacetat og 80 % methanol ekstrakter for hhv. polyacetylen og ginsenosider, blev det overvejet om analysen af ekstrakter ikke kunne rationaliseres således, at man lavede en metode til ekstraktion af både polyacetylen og ginsenosider kombineret med en analytisk HPLC metode. En metode til simultan-ekstraktion af både polyacetylen og ginsenosider blev udviklet, hvor det viste sig at ekstraktion først med methanol efterfulgt af 80 % methanol faktisk var lige så effektiv som ekstraktion først med ethylacetat efterfulgt af 80 % methanol. Ligeledes blev en analytisk HPLC metode udviklet som både kunne separere ginsenosider og polyacetylen i samme analyse. Et analytisk HPLC kromatogram fra analysen af et kombineret methanol/80 % methanol ekstrakt er vist i Figur 5.9.



Figur 5.9. Analytisk HPLC kromatogram af et kombineret methanol/80 % methanol ekstrakt fra en Amerikansk ginseng rod. Kromatogrammet viser fordelingen af ginsenosider (R_{b1} , R_{b2} , R_c , R_d , R_e og R_{g1}) og polyacetylenere (PaOH = panaxydol; FaOH = faltarinol) i ekstraktet, der blev adskilt på en Purospher STAR RP-18 kolonne (5 μ m; 250 \times 4 mm i.d.) ved 35 $^{\circ}$ C ved at benytte følgende gradient af solvent A (10 % MeCN–90 % H_2O [v/v]) og solvent B (75 % MeCN–25 % H_2O [v/v]): 0 min 0 % B, 5–15 min 15 % B, 26 min 20 % B, 36 min 22 % B, 45–50 min 35 % B, 55 min 40 % B 70–85 min 100 % B, 85–95 min 0 % B. Alle stigninger/fald i gradienten var lineær programmeret. Flow hastighed: 1 ml/min. Injektionsvolumen: 20 μ l. Detektion: Diode array detektor, der optog signaler fra 200–600 nm.

Som det fremgår af Figur 5.9, er den nye analyse metode til simultan analyse for ginsenosider og polyacetylenere sammenlignelig med analysemetoderne vist i Figur 5.7 og 5.8 for hhv. polyacetylenere og ginsenosider.

Indholdet af ginsenosider og polyacetylenere i forskellige rodstørrelser

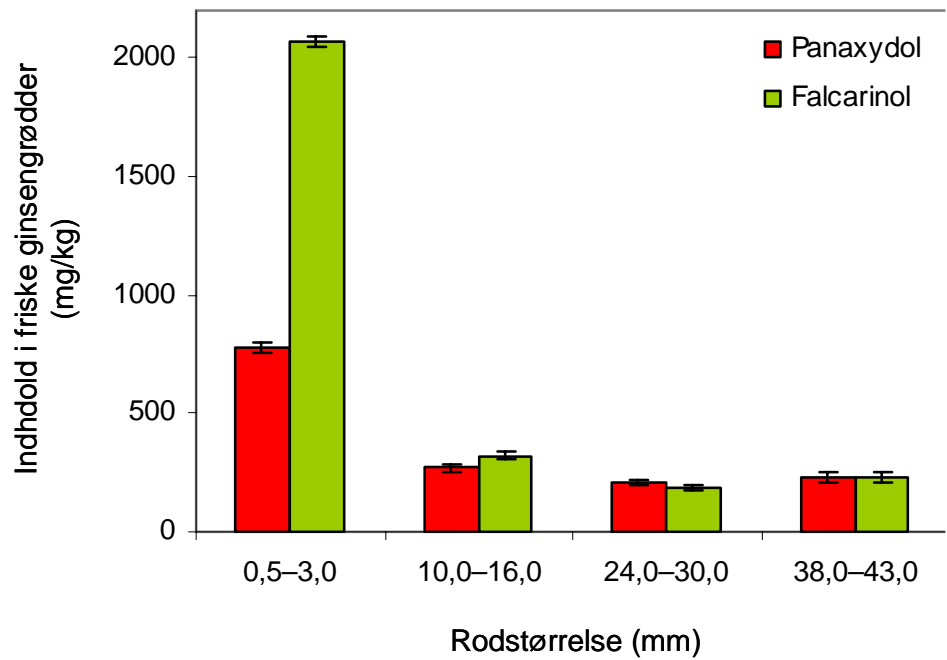
Ginseng rødder er meget forskellige i størrelse (Figur 5.10), selvom de dyrkes under de samme betingelser. Dette er et velkendt fænomen i ginsengproducerende lande, men også tilfældet for dansk dyrkede ginseng. Desuden er der store individuelle forskelle på hovedrodens størrelse samt antallet og størrelsen af siderødderne og rodhårene (Figur 5.10). Spørgsmålet er, om kvaliteten også er forskellig, dvs. om indholdet af aktivstoffer afhænger af ginsengrodens størrelse og/eller om aktivstofferne er lokaliseret bestemte steder i roden (hovedrod, siderod, rodhår). I projektet har vi bl.a. undersøgt indholdet af ginsenosider og polyacetylenere i enkeltrødder af forskellige størrelse. Resultaterne viste, at koncentrationen af såvel ginsenosider som polyacetylenere i enkeltrødder typisk varierer med en faktor 2 og i nogle tilfælde helt op til en faktor 3. Indholdet var dog ikke afhængigt af størrelsen af roden, hvilket bl.a. betyder, at man kan forbedre udbyttet, uden at det går ud over kvaliteten.



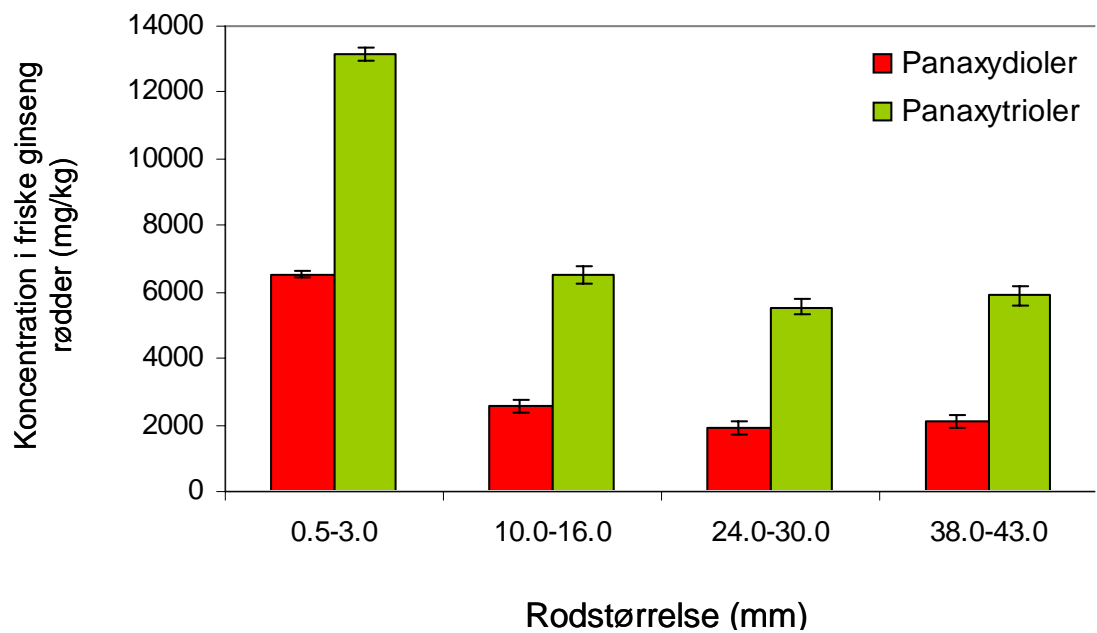
Figur 5.10. Størrelsen af enkelt ginsengrødder er meget forskellige. Her er to 5. års amerikansk ginsengrødder dyrket under samme betingelser og illustrerer de store fysiske forskelle der kan være på rødderne.

Indholdsstoffers fordeling i roden

Undersøgelse af ginsenosider og polyacetylenere i hovedrod, siderod og rodhår viste, at koncentrationen af aktivstoffer er fordelt forskelligt i roden. I hårrødder/mindre rødder med en diameter på 0,5–3,0 mm var koncentrationen helt op til 10 gange højere for nogle aktivstoffer sammenlignet med indholdet i hovedroden/større rødder med en diameter op til 43 mm (se Figur 5.11 og 5.12). Den store forskel i indholdet af aktivstoffer i de forskellige rodstørrelser kan benyttes til, at lave differentierede ginsengpræparater med et meget højt indhold af aktivstoffer sammenlignet med traditionelle ginsengpræparater, der ofte er lavet på hele tørrede ginsengrødder. Desuden viser resultaterne, at der ikke er stor variation i indholdet af aktivstoffer i den enkelte rod, når man ser bort fra de mindre rødder, idet der ikke er stor forskel på indholdet af aktivstoffer i de større siderødder sammenlignet med hovedroden. Dette betyder, at man målrettet kan selekttere for store rødder og højt indhold af aktivstoffer ved, at udtage enkelte store siderødder til analyse og så genplante resten af planten.



Figur 5.11. Eksempel på koncentrationen af bioaktive polyacetylenier i forskellige rodstørrelser i en enkelt amerikansk ginsengrod.



Figur 5.12. Eksempel på koncentrationen af bioaktive ginsenosider i forskellige rodstørrelser i en enkelt amerikansk ginsengrod.

Metode til ekstraktion af polyacetylen og ginsenosider fra enkelt ginsengrødder og andre ginsengprøver

Polyacetylen og ginsenosider fra enkelt ginsengrødder blev ekstraheret med hhv. ethylacetat og methanol og ekstrakterne analyseret ved HPLC. Inden ekstraktionen blev dele af enkeltrødderne (ca. 30 g) delt midt over i to stykker på langs (ca. 15 g hver). De to dele af ginsengroden blev derefter skåret i små stykker (1-2 mm²) hver for sig og blandet godt.

Ca. 10 g af hver findelt rod prøve blev herefter nøjagtig afvejet i en 100 ml bluecap flaske og findelt yderligere med en Ultra-Turrax T25 sammen med 30 ml 100 % ethylacetat, hvorefter ekstraktet fik lov, at henstå natten over i mørke ved stuetemperatur under omrøring. Herefter blev ekstraktionsvæsken (ethylacetat) dekanteret fra og der blev tilsat yderligere 30 ml 100 % ethylacetat, hvorefter prøven henstod yderligere natten over i mørke ved stuetemperatur under omrøring. Ekstraktionsvæskerne blev herefter samlet og der blev tilsat en lille mængde natriumsulfat for, at fjerne evt. vand fra det samlede ethylacetatekstrakt. Det samlede ethylacetatekstrakt blev herefter filtreret og inddampet til en samlet volumen under 50 ml på rotationsfordamper inden det blev hældt over i en 50 ml målekolbe. Volumen af det samlede ethylacetatekstrakt blev herefter justeret til præcis 50 ml med ethylacetat. Der blev fra dette samlede ekstrakt udtaget ca. 2 ml til HPLC-analyse. Inden analyse for polyacetylen ved HPLC-metoden blev prøven filtreret gennem et 0,45µm HPLC filter.

Det samme plantemateriale fra ekstraktion med ethylacetat, blev herefter ekstraheret med 30 ml 80 % methanol efter samme procedure som beskrevet ovenfor. Efter tilsætning af 30 ml 80 % methanol fik ekstraktet lov at stå natten over i mørke ved stuetemperatur under omrøring. Herefter blev ekstraktionsvæsken dekanteret fra og der blev tilsat yderligere 30 ml 80 % methanol, hvorefter prøven henstod yderligere natten over i mørke ved stuetemperatur under omrøring. Methanolekstrakterne (80 % methanol) blev herefter samlet og filtreret gennem et filtrerpapir. Det samlede 80 % methanolekstrakt blev herefter inddampet til en volumen under 50 ml på rotationsfordamper, hvorefter det samlede 80 % methanolekstrakt blev hældt over i en 50 ml målekolbe. Volumen af det samlede 80 % methanolekstrakt blev herefter justeret til præcis 50 ml med methanol. Der blev fra dette samlede ekstrakt udtaget ca. 2 ml til HPLC-analyse. Inden analyse for ginsenosider ved HPLC-metoden blev prøven filtreret gennem et 0,45µm HPLC filter.

Den ovenfor beskrevne ekstraktionsmetode for ekstraktion af polyacetylen og ginsenosider har vist, at være en effektiv metode til at ekstrahere disse stoffer fra friske ginsengrødder. Dog er metoden rimelig tidskrævende også når man tager i betragtning af, at analysen af hhv. ethylacetat- og metanolekstrakterne skal analyseres ved to forskellige HPLC metoder. Dette er baggrunden for udviklingen af en ny ekstraktions- og analyse metode for polyacetylen og ginsenosider.

Detaljerne omkring den nye ekstraktionsmetode vil blive offentliggjort i en videnskabelig publikation og vil derfor ikke blive beskrevet her i detaljer. I store træk er der med den nye ekstraktionsmetode blot tale om, at man kan ekstrahere både polyacetylen og ginsenosider ud med samme type opløsningsmiddel (hhv. methanol og 80 % methanol) hvilket gør det muligt, at forsimple ekstraktionsmetoden/proceduren samt, at måle begge type indholdsstoffer i samme HPLC analyse.

6. Analyse af aktivstoffer i ginseng bær

Lars Porskjær Christensen og Martin Jensen

Råvarerne til disse analyser er leveret af Martin Jensen, DJF-AHP og primæreksaktion samt analyse af ginsenosider og polyacetylenere er udført hos Lars Porskjær Christensen DJF-ARK.

Der er analyseret en række bærfraktioner, som har det mål at afklare hvilke stoffer og koncentrationer der findes i modne bær og om umodne bær fra tidligere høst har ændret profil og koncentration. Herudover er der analyseret forskellige delfraktioner af bær (saft, skal, pulp) for, at afklare hvordan fordelingen af indholdsstofferne varierer i bærrets forskellige dele.

I disse tests er det afgørende, at frøkomponenten er skilt fra bærrerne før ekstraktion for aktivstoffer påbegyndes, da det ellers er uklart om stofferne findes i frø eller frugtkomponenten.

Der er derfor fremstillet en række ekstrakter ved følgende processer: (se i øvrigt under forarbejdningsdelprojektet for yderligere kommentarer til ekstraktionsmetoderne her). Udvalgte prøver af disse er analyseret for ginsenosider og polyacetylenere.

Metode 1. Hele frugter adskilles i rensede frø og frugtpulp fraktion ved blendning i 30 sekunder efter tilsætning af lidt vand (total bær kontrol).

Hele bær-ekstrakt metode. Hele modne bær placeres i blender med kendt mængde ekstra vand tilført (volumen vand så bærrerne lige er dækket i blender) og derefter blendet ved laveste hastighed (laveste af 7 hastigheder) i 20-30 sekunder. Herved frigøres frø og frugt fra hinanden, i en let tyktflydende vandig masse. Denne sigtes igennem plast sigte med hulstørrelse ca. 2 x 2 mm. Frøet tilbageholdes mens bærmassen overvejende falder igennem sigten selv. En mindre mængde skum og lidt frugtkødsrester bliver hængende på sigten og frøet og skal enten skyldes igennem med lidt ekstra vand (evt. spray for minimalt vandtilførsel) eller slynges igennem sigten (f.eks. ved centrifugering) for at få 100 % udbytte. Tabet ved ikke at få den sidste rest med vurderes at være under 1 % vægtbaseret af den totalt udvundne frugtmasse. Processen efterlader en let fortyndet og findelt, vandig, rødlig bærekstrakt og en rensede frømængde, der er uskadt.

642,57 gram intakte bær blev blendet i ialt 600 gram DEM vand på laveste hastighed af 7 i laboratorium blender. Herefter blev væsken hældt ud på sigte med hulstørrelse ca. 2 mm. Frøene og lidt skum blev liggende på sigten, mens al væske løb igennem og blev opsamlet i rent fad under sigten. Ved at slå sigten forsigtigt mod kanten af fadet, er der kun lidt saft og skum tilbage på frøet i sigten.

Den opsamlede væskeekstrakt (koncentrat – metode 1) blev hældt direkte på plastdunk og lukket med tæt låg. Rest frøet og skum mv. blev skyllet kort med håndbruser igennem en sigte, hvorved der blev opsamlet en yderligere og tyndere 'Skyllevæske'. Denne placeredes ligeledes i plastflaske og blev mærket med 'Skyllevæske- metode 1'. Skylle væsker er ikke analyseret men gemt i fryser.

Udbytte = 1. Bær koncentrat = 869,41 gram (rødlig væske + lidt pulp)
1. Renset frø synkere = gode frø = 136,554 gram
1. Renset frø flydere = dårlige = 23,23 gram

Æstimat for mængde af ren bær i koncentreret ekstrakt: $642,57 - 136,55 - 23,23 = 482,78$ g.

Metode 2A Pressesaft ekstraktion (svarende til metode 2B rest bær)

Bær- presse saft. Hele modne bær placeres i trykpresse, og der trykkes en ren pressesaft ud af bærrene uden en forudgående ødelæggelse af bærrene. Princippet svarer til en æblepresse.

Processen efterlader en ren klar pressesaft uden farve (kun frugtskind indeholder rød farve), samt en pressekage med frø, der efterfølgende ekstraheres med vand som i metode 1.

Der er presset 481,5 g hele ginseng bær og her af er opnået 132 ml ren saft, og 293,9 g reste pressekage

Metode 2B. Blendning af restbær (inkl. skind), der tidligere er presset for ren saft.

291,76 gram restbær blendes i 500 gram DEM vand. Proces som ovenfor.

Udbytte = 2. Bærkoncentrat = 620,52 gram (rødlig væske + lidt pulp)
2. Renset frø synkere = gode = 111,86 gram
2. Renset frø flydere = dårlige = 5,26 gram

Mængde ren restfrugt i koncentrat.: $291,76 - 111,86 - 5,26 = 174,64$ g ren frugt.

Metode 3.A. Bærskinds fraktion.

Denne fraktion er speciel og kræver lidt ekstra håndtering. Bærskindet er ret tyndt og går let i stykker og er i frisk tilstand vanskelig, at separere fra restpulpen og frøet. I laboratoriet er frugtskindet fjernet manuelt med pincetter mv. fra frosne bær let optøet, hvilket er ekstremt tidskrævende. 553,34 gram hele bær blev frosset og skindet fjernet.

Udbytte: 98 gram rent skind.

Metode 3.B. Blendning af restbær, hvor bærskindet tidligere er fjernet manuelt.

Rest bærpulp + saft fraktion

De hele modne bær fra fraktion 3A, der har fået fjernet bærskindet, er efterfølgende separeret fra frøet med tilførsel af vand og blendning som i metode 1. Disse frugter har ligget på frost i nogle dage ved -23°C . 455,34 gram restbær blendes i 200 gram DEM vand.

Udbytte = 3. Frugt koncentrat = 539,21 gram (gullig væske med pulp)
3. Renset frø synkere = 155,67 gram
3. Renset frø flydere = 9,11 gram

Æstimat for mængde af ren frugt i koncentreret ekstrakt: $455,34 - 155,67 - 9,11 = 290,56$ g ren restbær.

Alle partier er gemt på $+0,5^{\circ}\text{C}$ til dagen efter hvor de fryses ned (-23°C).

Der er taget fotos af 3 af de vandige koncentreter (1, 2B og 3B) i gennemsigtige glas for, at visualisere farve forskelle med og uden den rødlige bærskind. De rødlige farvestoffer er udelukkende lokaliseret i skindet og ikke i pulpen, men er så kraftig at den kan farve en totalekstrakt af bær rødlig (se billede).

Kun koncentreterne og den rene bærskind analyseres for indholdsstoffer og testes i diabetes bioassay.

For oversigtens skyld er her samlet de mængder og bærkoncentrationer, der var i de undersøgte rækstrakter.

	Gram bær/væskemængde	
Metode 1	482,78 g bær/869,41 gram koncentrat	= 0,555 g bær /gram koncentrat
Metode 2A	132 ml presset	
Metode 2B	174,64 g ren bær/= 620,52 gram	= 0,281 g bær/gram koncentrat
Metode 3A	98 g ren bærskind	
Metode 3B	290,56 g ren restbær/539,21 gram	= 0,539 g bær/gram koncentrat

Fraktionsopdeling	skind	bær saft	pulpmasse
Metode 1: Hele bær	+	+	+
Metode 2A: Pressesaft fra hele bær	-	+	-
Metode 2B: Hele bær minus presse saft	+	-	+
Metode 3A: Bærskind alene	+	-	-
Metode 3B: Hele bær minus skind	-	+	+

Sammenligning af prøvernes indholdsstofferne og aktivitet skulle give en oversigt over hvor aktivstoffer primært er i bærret.

Desuden kan denne viden benyttes til, at vurdere muligheden for at udnytte bær til, at lave specialprodukter til salg på baggrund af viden om deres indholdsstoffer.



Special ekstrakter af ginseng bær: Fra venstre: Blendet vandekstrakt af hele bær. Midt: Blendet vandekstrakt af bær efter saft er presset fra. Højre: Blendet vandekstrakt af bær hvor den røde skal er fjernet forud. Farven er lokaliseret alene i bærrets skind.

Undersøgelse af effekten af bærmodning på indholdsstoffer og aktivitet.

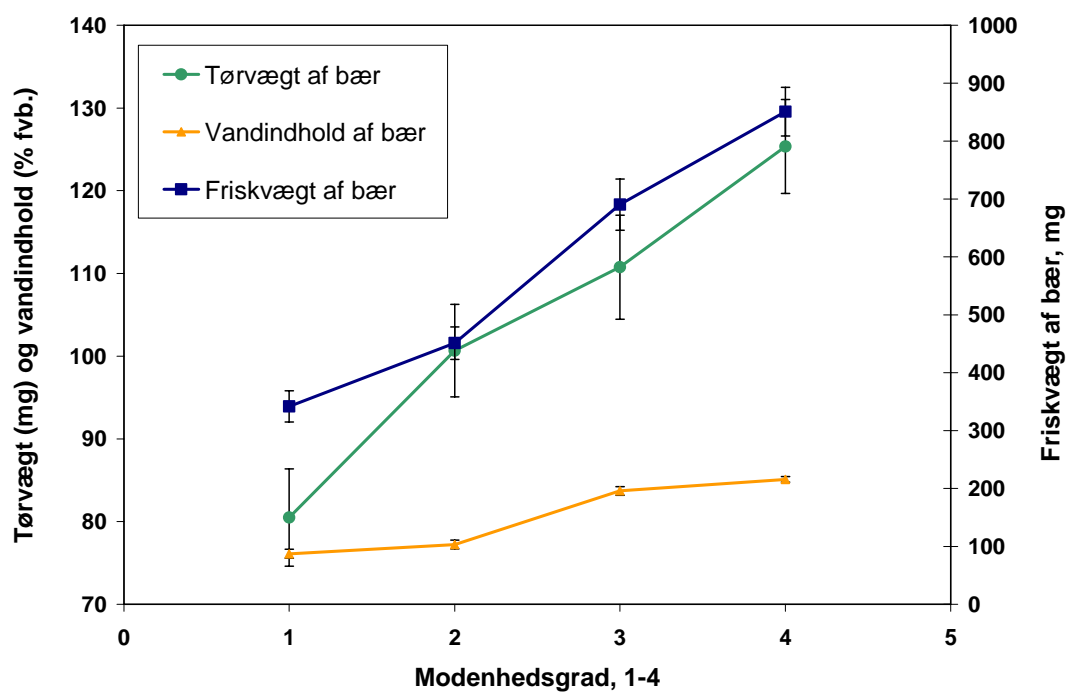
Da ginseng bær modner over et langt tidsrum på 2-4 uger, er der på samme tid både umodne grønne og modne røde bær dels på samme plante og på forskellige planter. Der er høstet bær på ét tidspunkt ca. 2 uger før fuld modenhed af alle bær. Bærrene er inddelt i 4 modenhedsgrader. Inddelingskriterier bestod af en visuel vurdering af farve, tekstur og størrelse af bær. På trods af, at hver kategori blev tilnærmet en ens modenhed var der stadig en vis spredning og variation indenfor hver kategori. Fotos af bær ved forskellige modenhedsgrader er vist på billedet. Bærrene til biokemiske analyser blev frosset ved -23°C umiddelbart efter høst.

1. Helt grønne, hårde bær, der sidder godt fast på stilken, skal rives af generelt. Primært taget fra stilke, hvor alle bær var grønne endnu.
2. Grøn-gullige bær delvis med purpur kind, sidder ret fast.
3. Postkasserøde, fuldt udviklede bær, men faste og hårde med intakt bærskind.
4. Meget røde og meget bløde bær, der sidder meget løst og falder af ved mindste berøring. Begyndende henfald og nedbrydning af bærskind.

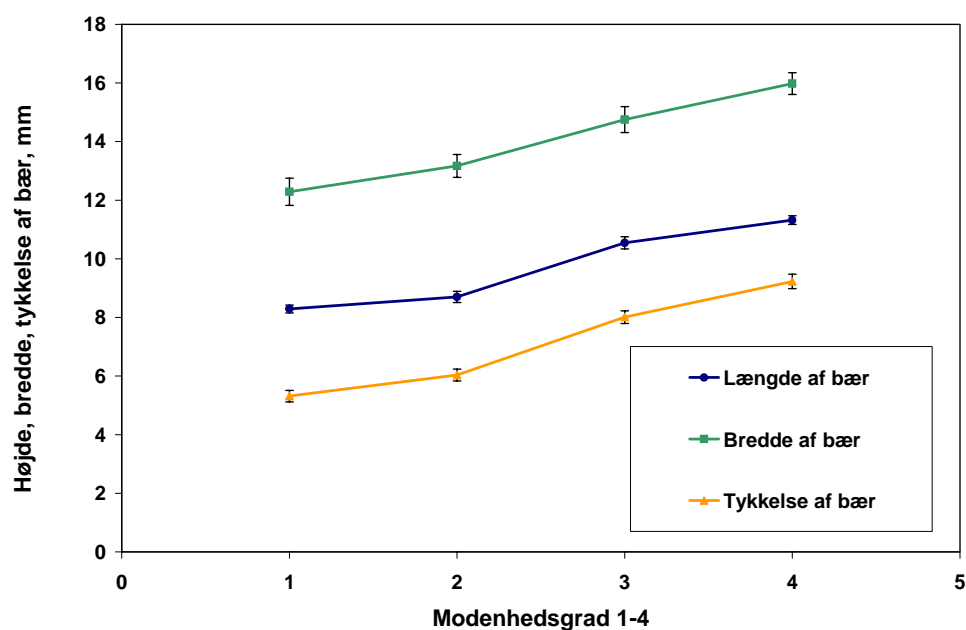
Som reference til indholdsstofferne blev der målt tørstof og vandindholdsændringer i bærrene, Brix tal (opløseligt tørstof = lavmolekylært sukker), størrelse og farve af 25 enkeltbær i hver kategori. Tallene vist i tabellen og figuren er gennemsnit af 25 frugter i hver kategori. De 25 frugter blev bevidst valgt fra mange forskellige planter for, at reducere evt. enkeltplanteforskelle mest muligt i denne måde, at undersøge modenhed på. En alternativ måde, at analysere modenhed på kunne være, at høste enkelte bær fra samme bærstand med en uges interval over hele modningsforløbet på basis af mange planter. Af ressourcemæssige grunde blev denne metode ikke valgt, og det vurderes at den anvendte metode giver et tilfredsstillende grundlag for, at vurdere effekten af modenhed.



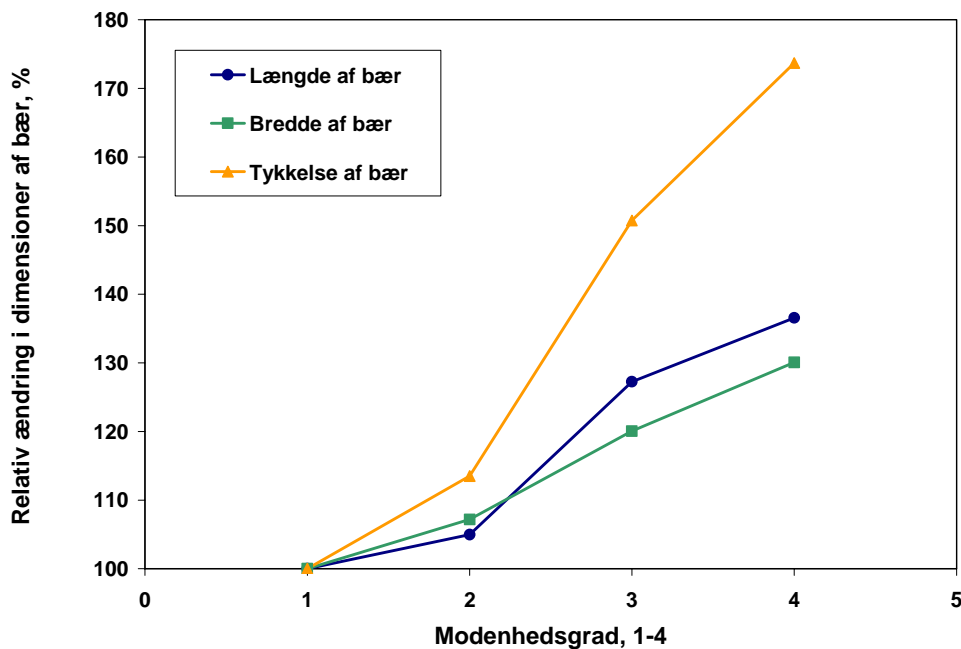
Ginseng bær – modenhed 1 til 4



Figur 6.1 Ændringer i gennemsnitlig friskvægt, tørvægt og vandindhold i bær af amerikansk ginseng afhængig af modenhedskategori fra 1 – 4. (fra 1 grøn umoden til 4 blød og dybrød fuldmoden bær). Data er gennemsnit og standardfejl på 25 enkeltbær i hver kategori.



Figur 6.2 Ændring i højde, bredde og tykkelse af bær af amerikansk ginseng afhængig af modenhedskategori 1 – 4 (fra 1 grøn bær til 4 fuldmodent rødt og blødt bær). Højden er målt på længdeaksen af frugten fra stilkfasthæftning til frugt spids. Bredden er afstanden på tværs af længdeaksen på største afstand mellem de 2 bærdeler (oftest 2 frøede bærdeler). Tykkelsen er målt som tykkelsen af hver enkelt bærdel, der omslutter et enkelt frø på den flade side. Data er gennemsnit og standardfejl af 25 enkeltbær pr modenhedskategori.



Figur 6.3 Relative ændringer i længde, højde og tykkelse af bær af amerikansk ginseng afhængig af modenhedskategori 1-4 (fra 1 grøn til 4 fuldmodent rødt og blødt bær). Kategori 1 er sat til 100 %.

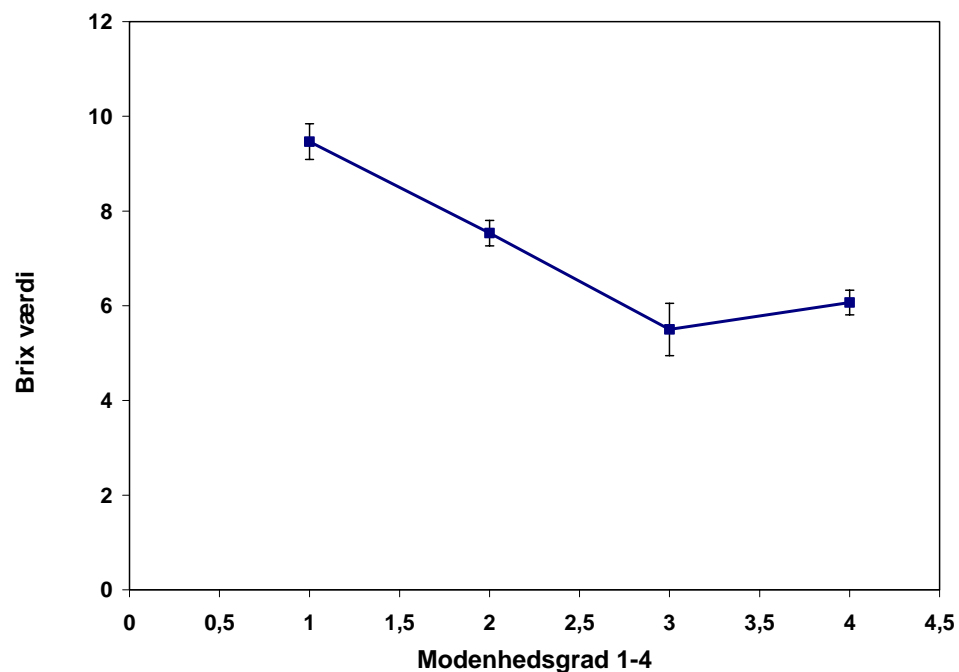
Det ses at tykkelsen af bærret der dækker det enkelte frø stiger væsentlig mere end længde og bredden af bærret med øget modenhed.



Varierende bærform afhængig af antal frø i bærret.

Det ses at tørvægten fortsat stiger frem til fuldmodent stadie. Vandindholdsprocenten stiger også ved øget modenhed, hvilket er udtryk for, at frugtvævet langsomt nedbrydes og udvikles til mere et saftholdigt bær.

Bærrets tilvækst i størrelse er set i absolutte mål af ca. samme størrelse, mens tykkelsen i relative mål vokser væsentlig stærkere end længde og bredde af bærret.

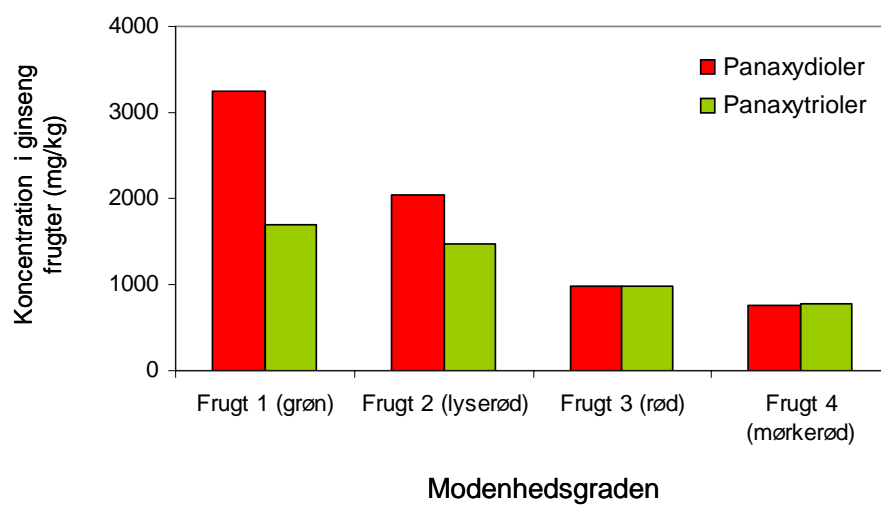


Figur 6.4 Ændring i Brix værdi (opløseligt sukker) afhængig af øget modenhedsgrad fra 1 til 4 (1 grønt bær til 4 fuldmodent bær). Data er gennemsnit og standardfejl af 3 målinger hver gennemført på ca. 3 bær i hver kategori.

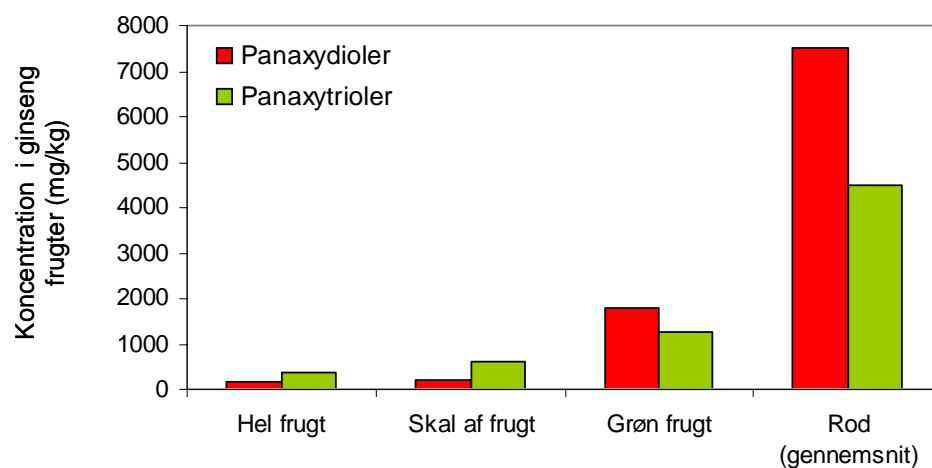
Det faldende Brix tal er lidt overraskende, da modne frugter normalt udvikler højere Brix tal med øget modenhed. Måske kan det skyldes en fortyndingseffekt forårsaget af den øgede vandindholdsprocent i bærrerne. Alternativt forbruges eller nedbrydes disse lavmolekylære sukkerarter hen mod fuld modenhed. Niveauet i den fuldt modne frugt er noget lavere end i f.eks. meget konsum frugt.



Bærmodenhed i de 4 kategorier fra grøn og umoden til fuldmoden blødt bær

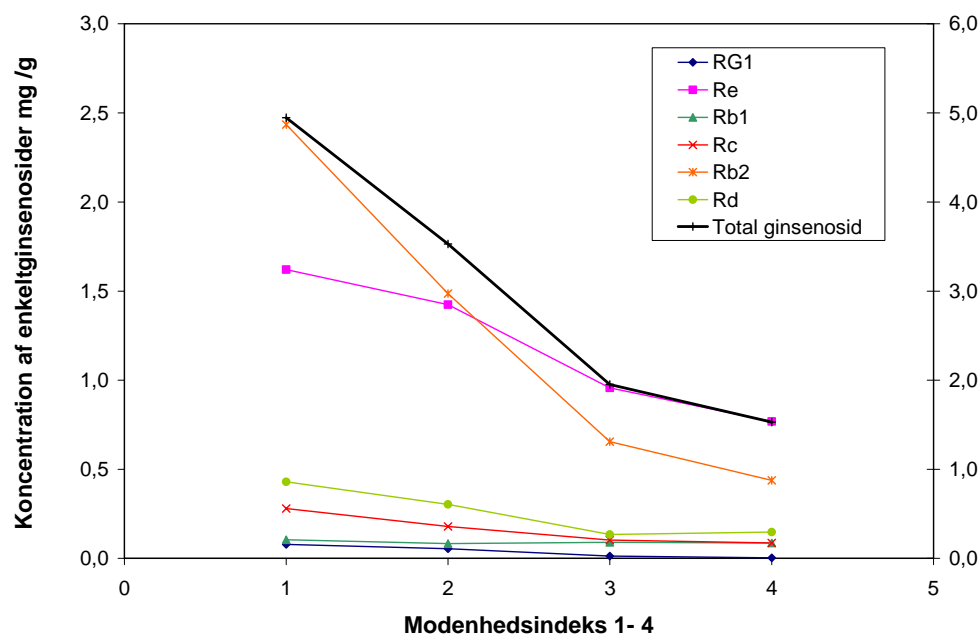


Figur 6.5. Koncentration af de to hovedgrupper af ginsenosider i bær af forskellige modenhed.

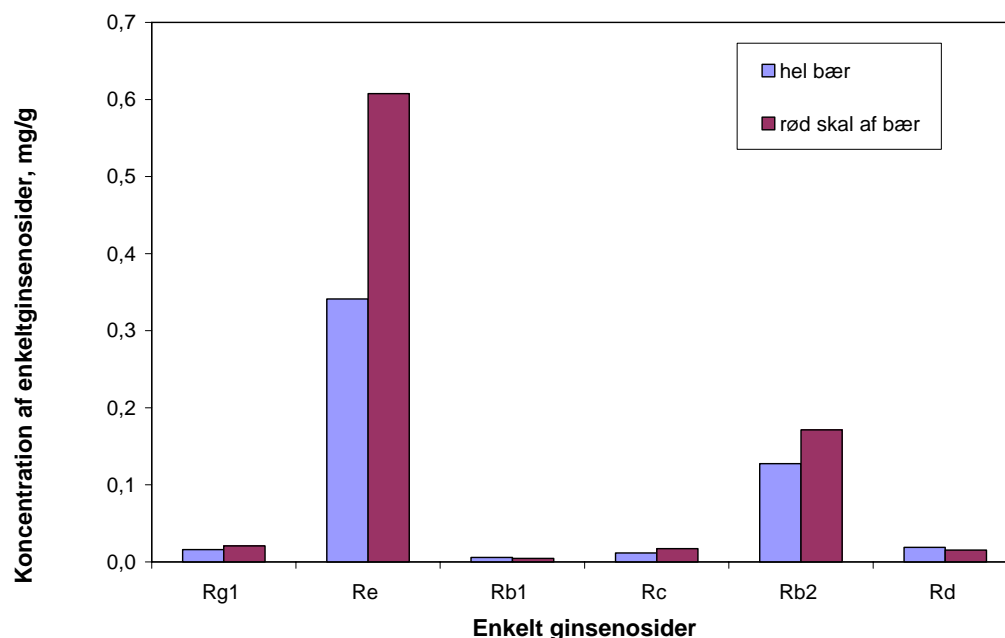


Figur 6.6. Koncentration af de to hovedgrupper af ginsenosider i skal af bær eller hele bær i sammenligning med en hel grøn frugt og indholdet i rødder.

Generelt er ginsenosid indholdet lavt i bær i forhold til rødder og falder kraftigt med øget modenhed. Der er kun marginal forskel mellem koncentrationen af ginsenosider i skallen i forhold til i hele bærret. Det er derfor sandsynligt at ginsenosiderne er relativt jævnt fordelt i hele bærret. Det er dog markant at Rb2 og Re findes i højest koncentration i bærrene mens Re og Rb1 er de dominerende i roden (se figur 6.7 og 6.8).



Figur 6.7. Ændring i de forskellige enkeltginsenosider i forhold til de fire modenhedsstadier (1 helt grønt bær, til 4 helt rødt og blødt bær). Rb2 og Re findes i høj koncentration i grønne bær men falder kraftigt med øget modenhed.



Figur 6.8 Forskelle i koncentration af 6 enkeltginsenosider i hele bær kontra i den røde overhud på bærret alene. Der er en klar tendens til højere koncentration i den røde bærskind fraktion, mest tydelige i Re og Rb2.

7. Indledende bioassay af bærprodukter - diabetes

Karsten Kristiansen og medarbejdere.

Bærprøver er leveret af Martin Jensen, DJF-AHP til Lars Porskjær Christensen, DJF-ARK, som har lavet ekstrakter, som efterfølgende er sendt til Karsten Kristiansen, SDU-BMB.

Testning af anti-diabetes egenskaber i ginseng bær (samme ekstrakter som i delprojekt 6) er udført hos Karsten Kristiansen, SDU, BMB. Resultater er beskrevet i nedenstående rapport fra SDU sammen med analyserne af anti-diabetiske effekter af enkeltginsenosider. (se rapport for delprojekt 8).

Nedenfor er listet de bærekstrakter og formuleringer der er sendt til testning ved SDU i sommeren 2005 mens yderligere prøver er sendt til testning senere. Ikke alle resultater er inkluderet i nærværende rapport pga af senere analyser, men offentliggøres separat.

Ginseng ekstrakter fra frugter sendt til testning

Ginseng frugt. Pressesaft fra hel frugt:

Pulp filtreret (volumen 118 ml vandig ekstrakt). Inddampet til 15 ml, analyseret og sendt til testning.

Ginseng pulp. 1. koncentrat:

Pulp filtreret (væske 610 ml vandig ekstrakt). Inddampet til 26,5 ml, analyseret og sendt til testning.

Ginseng pulp. 2. koncentrat:

Pulp filtreret (væske 445 ml vandig ekstrakt). Inddampet til 13 ml, analyseret og sendt til testning.

Ginseng pulp. 3. koncentrat:

Pulp filtreret (væske 375 ml vandig ekstrakt). Inddampet til 10 ml, analyseret og sendt til testning.

Ethylacetat og methanol ekstrakt af hel frugt og vandig ekstrakt af bundfald fra ethylacetat ekstraktet (3 forskellige ekstrakter):

91 g ginseng hel frugt (frossen) blev ekstraheret med hhv. 150 ml og 100 ml ethylacetat efterfulgt af ekstraktion med hhv. 150 ml og 100 ml 80 % methanol.

Ethylacetat ekstraktet (ca. 250 ml) blev inddampet til tørhed og genopløst i 5 ml ethylacetat. Det koncentrerede ethylacetat ekstrakt blev analyseret for polyacetylen/ginsenosider og sendt til testning.

Et rødt bundfald fra ethylacetat ekstraktet blev opløst i 5 ml vand (kunne ikke opløses i ethylacetat). Dette ekstrakt er = vandig ekstrakt af bundfald fra ethylacetat ekstrakt af hel frugt og blev ligeledes sendt til testning.

Methanol ekstraktet (ca. 250 ml) blev inddampet til tørhed og genopløst i 10 ml 80 % methanol. Det koncentrerede methanol ekstrakt blev analyseret for polyacetylen/ginsenosider og sendt til testning.

Ethylacetat og methanol ekstrakt af skaller fra frugt og vandig ekstrakt af bundfald fra ethylacetat ekstraktet (3 forskellige ekstrakter):

98 g ginseng skaller fra frugt (frossen) blev ekstraheret med hhv. 150 ml og 100 ml ethylacetat efterfulgt af ekstraktion med hhv. 150 ml og 100 ml 80 % methanol.

Ethylacetat ekstraktet (ca. 250 ml) blev inddampet til tørhed og genopløst i 5 ml ethylacetat. Det koncentrerede ethylacetat ekstrakt blev analyseret for polyacetylen/ginsenosider og sendt til testning.

Et rødt bundfald fra ethylacetat ekstraktet blev opløst i 5 ml vand (kunne ikke opløses i ethylacetat). Dette ekstrakt er = vandig ekstrakt af bundfald fra ethylacetat ekstrakt af skaller og blev ligeledes sendt til testning.

Methanol ekstraktet (ca. 250 ml) blev inddampet til tørhed og genopløst i 10 ml 80 % methanol. Det koncentrerede methanol ekstrakt blev analyseret for polyacetylen/ginsenosider og sendt til testning.

8. Anti-diabetisk effekt af isolerede enkelt ginsenosider

Karsten Kristiansen og medarbejdere

Først bringes et generelt review (på engelsk som øvrige reviews) af området vedr. udvikling af anti-diabetes medicin og derefter følger den specifikke del omkring de gennemførte undersøgelser (på dansk).

Identification, characterization and pre-clinical development of compounds from ginseng with potential anti-diabetic effects

Karsten Kristiansen, Lise Madsen, Rasmus Koefoed Petersen, Hongbin Zhang and Philip Just Larsen

Correspondence:

Karsten Kristiansen
University of Southern Denmark
Dep. Of Biochemistry and Molecular Biology
Campusvej 55, 5230 Odense M, Denmark
Direct dial: (+45) 65 50 24 08
Fax: (+45) 65 50 24 67
E-mail: kak@bmb.sdu.dk

Aims of the report

The aims of this report are:

- To provide a background for why novel drugs for the treatment of type 2 diabetes are needed and briefly describe why compounds from ginseng are interesting candidates for the development of novel drugs. The latter aspect was dealt with in greater detail in the previous report on bioactive ginseng compounds.
- To describe the desirable profile for novel insulin sensitizers
- To illustrate a screening program suitable for the identification of novel potential anti-diabetic drugs from ginseng.
- To describe the extensive pre-clinical in vitro and in vivo testing program which will be necessary for the first progress towards a novel drug.
- To summarize the data obtained from the screening of ginseng compounds supplied during the course of the project from The Danish Institute of Agricultural Sciences, Department of Food Science, Aarslev and from the Kunming Institute of Botany, Kunming, China.
- To indicate which compounds/extracts would be of interest for further investigation.

Background

According to the latest figures from WHO, an estimated 171 million adults (> 20 yrs) suffered from diabetes mellitus in 2000. Among these adults, type 2 diabetes comprises 90-95 % of the cases. Furthermore, it is estimated that only 50-60 % of people with type 2 diabetes or in stages preceding overt type 2 diabetes are currently diagnosed.

Thiazolidinediones (TZDs) are a group of insulin sensitizers that have been used in the treatment of type 2 diabetes since 1997. Two such compounds are currently available for clinical use: **rosiglitazone** and **pioglitazone**. Both are characterized by their ability to improve insulin sensitivity and reduce fasting hyperglycaemia and insulinaemia. Moreover, the TZDs are able to reduce plasma levels of triacylglycerol, free fatty acids and LDL-cholesterol in patients with type 2 diabetes. Oral anti-diabetic compounds are used as first choice pharmacotherapy for type 2 diabetes. Consequently this is by far the largest market because only 5-10 % of type 2 diabetes patients are totally dependent on insulin therapy. With the steadily growing number of diabetes patients, this market is expected to grow by 20 % annually. Both now and in the foreseeable future, the US will be the largest market for type 2 diabetes agents; mainly because TZDs in the US are used as monotherapy, in combination with oral anti-diabetic agents as well as in combination with insulin, whilst most European health authorities have recommend restriction of TZD therapy for patients in combination with metformin and/or sulfonylureas or for those unsuccessfully treated with either of these drug classes. Oral anti-diabetic drugs comprise the tenth largest therapeutic class with sales growth well above 20 %. In 2002, total sales of oral anti-diabetic compounds amounted to 5,257 billion USD, of which the US market revenues were 3.5 billion USD. With a modest forward projection of current sales figures, market for oral anti-diabetic compounds is expected to be around 8.5 billion USD in 2006 of which TZDs alone have a share of 5 billion USD.

The need for novel insulin sensitizers

Actos (pioglitazone) from Takeda/Eli Lilly and **Avandia** (rosiglitazone) from GSK are considered generally effective to treat type 2 diabetes. They typically lower plasma glucose by c. 5-6 mg/ml relative to placebo. However, they provoke significant side effects, in particular:

- Fluid retention and edema
- Heart failure in 3-7.5 % of patients, increasing to 15 % of patients also on insulin
- Weight gain of ca. 4 Kg per 0.1% increase in insulin sensitivity

Rezulin (troglitazone) from Parke-Davis/Warner-Lambert was the first clinically approved PPAR γ drug but it was withdrawn from the market because it induced liver toxicity and in some cases death.

TZDs are believed to mediate their action by binding to and activate the peroxisome proliferator activating receptor (PPAR). Activation of PPAR results in increased expression of genes involved in glucose and lipid metabolism, and the repression of a subset of genes involved in inflammation. The key role of PPAR in mediating the pharmacological actions of TZDs is, however, challenged by the fact that PPAR is predominantly expressed in adipose tissue, whereas skeletal muscle accounts for the majority of insulin-regulated whole body glucose disposal and is the major site of insulin resistance. Although, the expression of PPAR is low in skeletal muscle and more or less absent in liver (Braissant et al. 1996), TZDs are able to increase insulin sensitivity in liver and skeletal muscle in addition to adipose tissue.

PPAR is the master regulator of fat cell (adipocyte) differentiation (Barak et al. 1999; Koutnikova et al. 2003; Kubota et al. 1999; Rosen et al. 1999). Forced expression of PPAR and/or administration of PPAR-ligands induce adipocyte differentiation of fibroblasts as well as myoblasts *in vitro* (Hu et al. 1995; Wu et al. 1995). Administration of synthetic PPAR ligands to various strains of rats leads to a dose-dependent increase in fat mass (Chaput et al. 2000; de Souza et al. 2001; De Vos et al. 1996; Hallakou et al. 1997) and generation of new small adipocytes (de Souza et al. 2001; Okuno et al. 1998). Thus, synthetic PPAR-activators are able to induce adipocyte differentiation both in vitro and in vivo. Accordingly, a major drawback of treatment of type 2 diabetic patients with TZD is, as mentioned above, increased body fat gain. This is of great concern as excess body fat, especially intra-abdominal body fat accumulation, is one of several hallmarks typifying the metabolic syndrome and as such an independent risk factor of type 2 diabetes. The long-term metabolic consequences of the increased fat accumulation accompanying treatment with PPAR γ agonists are not fully elucidated.

Classification of PPAR ligands

PPAR ligands can be grouped into three distinct classes: full agonists, partial agonists/partial antagonists and full antagonist. Agonists and antagonists are characterized by their binding affinities, dictating potency/EC₅₀/IC₅₀ values, and by the level of activity, which is attained in the presence of saturating levels of the compounds, i.e. efficacy. A partial agonist/partial antagonist is also characterized by its binding affinity, and efficacy. A partial agonist/partial antagonist is unable to fully activate the cognate nuclear receptor and can in a competitive manner displace a full agonist from the receptor and thereby diminish the level of transactivation. Full and partial agonists furthermore may recruit different complements of cofactors, and the nature of the cofactors recruited to a given PPAR subtype may profoundly influence the pattern of genes activated by a given agonist. Dual and pan-agonists are ligands that activate more than one PPAR isoform.

Desirable profile of novel insulin sensitizers

We have for several years been studying the role of specific fatty acids and PPARs in controlling lipid homeostasis and adipocyte differentiation and function. These studies and numerous studies performed in leading laboratories abroad have led to the concept that the molecular function of the PPARs can be modulated by the nature of the ligand that binds to the PPARs. This modulation of PPAR function is caused by differential recruitment of so-called cofactors, which ultimately determine the molecular activity of the

PPARs. Importantly, it can be hypothesized that the “right ligand” by recruiting the correct set of cofactors might improve insulin sensitivity without increasing development of new fat cells. In fact, recent publications indicate that this is a real possibility. However, until now most development in pharmaceutical companies has been more focussed on the identification of synthetic ligands with high affinity and specificity than on the identification of ligands with selective recruitment of cofactors. Furthermore, ligand identification is almost exclusively done by screening of chemical libraries and modification of selected lead compounds, neglecting the fact that PPARs are activated by naturally occurring compounds.

Based on available evidence we have suggested that a desirable profile of a novel insulin sensitizer should have the following characteristics.

- Be a partial PPAR agonist (or possible also a partial PPAR agonist, i.e. a dual PPAR/PPAR agonist, as this might have a beneficial effect on fatty acid oxidation in muscle and plasma HDL cholesterol). Partial PPAR agonists appears the have give less edema.
- Have full insulin sensitizing effect.
- Have little or no positive effect on adipocyte differentiation
- Possibly be able to recruit co-factors that would tend to increase energy expenditure in fat.

Bioactive compounds from ginseng as potential antidiabetic drugs
Several different plants are often referred to as ginseng. These plants include Chinese or Korean ginseng (*Panax ginseng*), Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*), American ginseng (*Panax quiquefolius*) and Japanese ginseng (*Panax japonicus*). In this project emphasis is on Chinese ginseng and American ginseng. There is probably not a single illness which has not been claimed to benefit from ginseng. In the context of diabetes, however, there are a number of well documented reports that clearly indicate that at least some preparations from ginseng are of interest for a rational treatment of diabetes (For a review see, Yeh et al., 2003, and the previous report on bioactive substances from ginseng). Thus was recently shown that Ginsenoside 20(S)-Protopanaxatriol, the aglycone of ginsenoside Rg₂, activates PPAR in 3T3-L1 cells (Han et al. 2006). Extract of *Panax ginseng* berry and ginsenoside Re have been reported to have antidiabetic effects in *ob/ob* mice (Attele et al 2002), and oral administration of white ginseng radix (Ginseng Radix Alba, GRA) and the rootlet (Ginseng Radix Palva, GRP) leads to upregulation of PPAR protein expression (Chung et al 2001). Dietary mulberry, Korean red ginseng and banba were shown to increase the expression of liver PPAR α and adipose tissue PPAR in mice (Park et al 2005)

Konjac-mannen ginseng was reported to increase insulin sensitivity and American ginseng to enhance insulin secretion (Vuksan 2001). Finally, testing of the 8 main ginsenosides revealed that ginsenoside Rf is the most potent of the ginsenosides in activating PPAR α (Lee et al 2006), an action that indirectly may improve insulin sensitivity by decreasing plasma triglycerides due to enhanced fatty acid oxidation in liver.

Characterization of the active components in ginseng

The development program outlined below is designed to identify clinically interesting novel chemical entities from ginseng acting preferentially as PPAR γ agents. As mentioned above, currently marketed PPAR γ agonists, pioglitazone and rosiglitazone, both give rise to side effects, some of which have given rise to black box warning of excluding diabetes patients with cardiac incompetence. Other adverse events associated with PPAR γ agonists include: oedema, adiposity, ovulation in anovulatory women, myalgia. Henceforth, a discovery and development algorithm should focus not only on efficacy on relevant clinical end points, but large efforts should also be placed on characterizing potential side effects. By doing so selection of compounds with possessing marked differentiation points to existing drug development candidates becomes possible.

In vitro studies

Bioactive compounds from ginseng species are evaluated by four different in vitro assays to determine their functional potencies. Obviously, in search for PPAR selective compounds, binding to and activation of each of the three receptors are essential for their characterization. Functional *in vitro* studies imply tests for transcriptional activation/repression; tests for target tissue differentiation and tests for target tissue insulin sensitivity.

Transactivation assays

Transactivation assays comprise the classic gold standard assay for screening and selection of PPAR compounds. Such assays make it possible to screen for functional activity and potency in mammalian cells. However, several low affinity PPAR γ agonists have proven essentially without efficacy on target tissue gene expression despite the fact they have excellent glucose lowering effects. The relationship between PPAR γ its ligands and insulin sensitivity is rather complex. Thus, enhanced insulin-sensitivity induced by PPAR γ agonists may come as a result of both activated and repressed transcription. Also, in 3T3L1 cells carrying a dominant negative PPAR γ mutant, PPAR γ agonists are still efficacious as glucose lowering agents (Nugent et al., 2001), suggesting that non-receptor mediated effects of PPAR γ agonists can not be excluded. Despite these limitations, the transactivation assay is often considered predictive of functionality of screened drugs. Transactivation assays are also applicable for assessing whether compounds from ginseng are full or partial nuclear receptor agonists.

Box 1 – Transactivation assay

Human PPAR2 expression vector is constructed by inserting the PPAR2 cDNA coding region into a pcDNA3.1 vector. The Gal4 based vector is constructed by inserting the ligand binding domain of human PPAR γ into the pM vector from in vitro. The reporter gene is luciferase controlled by the ACO PPRE or the UASgal enhancer. As a control vector a bacterial β -galactosidase controlled by the SV40 early promoter or the CMV promoter is used. About 2.7×10^4 HEK293 human embryonal kidney cells (ATCC) or mouse embryonic fibroblast from retinoblastoma deficient embryos are plated into a 35-mm tissue culture dishes and maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10 % stripped fetal calf serum for 24 hours. Expression (25 ng), reporter (100 ng/dish), and control (2.5 ng/dish) vectors are transfected using a lipofection reagent. At 24 hours after transfection, cells are treated with vehicle or compounds at the indicated concentration and incubated for 24 hours. Each treatment is conducted in triplicate. Each culture dish is assayed for firefly luciferase activity normalized by β -galactosidase activity to account for differences in transfection efficiency. Luciferase and β -galactosidase activity are measured using a luminometer.

Binding studies

Effects on PPAR γ -mediated transactivation can be exerted via non-PPAR γ dependent processes such as activation of kinase. Therefore, it is important to demonstrate that a given compound indeed binds to the ligand-binding domain of PPAR γ . Binding studies can be performed using several methodologies, one possibility being via scintillation proximity assay (SPA).

Adipogenesis studies

Box 2 – Scintillation proximity assay

PPAR ligand binding domains of either PPAR, PPAR, or PPAR are expressed in *E. coli* or yeast as PolyHis-tagged fusion proteins and subsequently purified as described. Briefly, the purified ligand binding domains are labelled with biotin and immobilised with streptavidin-modified scintillation proximity beads. Beads are subsequently incubated with constant amount of relevant selective PPAR ligand (rosiglitazone for PPAR, WY14,643 for PPAR, and GW501516 for PPAR) and variable amounts of the test substance in question. After equilibrium is obtained, the radioactivity bound to the beads is counted in a scintillation counter. Non-specific amount of binding is assessed in control wells to which excess amount of non-labelled specific PPAR ligand, and this value is subtracted from each data point. For each of the compounds tested non-linear least fit plots are constructed to calculate K_i values assuming simple competitive binding takes place.

Another commonly employed *in vitro* test for PPAR compounds is assessing differentiation of 3T3-L1 cells or similar undifferentiated pre-adipocyte cell line to mature adipocytes. However, the normal protocol for differentiation of 3T3-L1 cells cannot be followed as this will lead to differentiation even in the absence of added PPAR γ ligands. We have developed a very sensitive modification according to which differentiation of 3T3-L1 cells is strictly dependent on the addition of a PPAR γ agonist.

Box 3 – Adipogenesis

Adipogenesis in 3T3-L1 fibroblasts is performed according to the protocol developed at BMB. The 3T3-L1 cells are grown DMEM plus 10 % calf serum in 12 well plates until confluence, and maintained at confluence for 2 days. Then the cells are treated with either vehicle or test compound in increasing concentration (not exceeding 0.1 % vehicle) in the presence of 1 μ M dexamethasone in DMEM supplemented with 10 % fetal calf serum. Medium is changed every two days, and the cells are fixed and stained with Oil-Red-O on day 8 or day 10. For this cells are washed with PBS twice and fixed in 10 % formalin in PBS. After washing in PBS, cells are stained with freshly diluted Oil-Red-O in isopropanol for 1 hour at room temperature. The cells are washed 5 times with PBS and visualized using a microscope. Quantitative accumulation of triglyceride is also measured under similar experimental conditions, except in this case cells are plated in 100-mm tissue culture dishes and culture continued for 10 days. Triglyceride is extracted with methanol: chloroform (2:1) mixture. To monitor the efficiency of recovery, ^3H -cholesterol oleate (50,000 cpm/well) is added in each tube as tracer before extraction. Extracted triglyceride was measured by a colorimetric assay (GPO-Trinder, Sigma) according to manufacturer's instructions.

Glucose uptake studies

PPARs improve insulin sensitivity and henceforth promote glucose up take in target tissues. Given the right conditions are present this could potentially promote glycogen deposition in liver and muscle. However, few laboratories have included test of glycogen synthesis in their screen for PPAR γ activity.

Box 4 – Glucose uptake

Basal glucose uptake can be measured in differentiated 3T3-L1 adipocytes. Briefly, 3T3-L1 fibroblasts are differentiated to adipocytes by treatment with porcine insulin (1 g/mL for 4 days), dexamethasone (0.25 mol/L for first 2 days), and isobutyl methyl xanthine (IBMX, 0.5 mmol/L for first 2 days). Differentiated adipocytes are incubated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) containing 10 % fetal bovine serum (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) with various concentrations of drug in question or vehicle for 48 hours in 24-well plates, in triplicate. Cells are washed with phosphate-buffered saline ([PBS], 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L KH₂PO₄, 3 mmol/L Na₂HPO₄; pH 7.4) and incubated in glucose-free DMEM for 2 hours at 37°C. The cells are washed 3 times with Krebs Ringer phosphate buffer (KRP). Glucose uptake is initiated by addition of 0.25 Ci 2-¹⁴C(U)-deoxy-D-glucose (300 Ci/mmol) per well and the cells are incubated for 10 minutes at room temperature in the presence of 0.1 mmol cold 2-deoxy-D-glucose. Finally, the cells were washed 3 times with ice-cold PBS containing 10 mmol/L cold glucose, lysed with 0.5 % SDS, and counted in a scintillation counter.

Box 5 – Co-factor recruitment assay

ME3 cells are grown in 24 well dishes to approximately 60 % confluency in DMEM supplemented with 10 % calf serum and then transiently transfected by the Metafectene "method". Per well: 0.35 g DNA total in 30 l DMEM (without antibiotics), 1 l metafectene in 30 l DMEM (without antibiotics). Cells are transfected with a PPRE-containing Luciferase reporter plasmid (PPRE-TK-Luc), a vector expressing full-length human PPAR₂, a vector expressing the testet co-factor and a cmv--gal normalization vector using the following amounts per well: PPRE-TK-Luc: 0.1 g, hPPAR₂: 0.025 g, CMV--gal: 0.025 g, Co-factor: 0.020-0.200 g. Mix, wait 20 min and put on cells. "Empty" expression vectors are supplemented to assure equal promoter load. Six hours after transfection media are changed to DMEM+antibiotics supplemented with: 0.5 % Ethanol, 0.1 % DMSO or 1.0 to 10 M of the test compound. Approximately 16 hours later cells are harvested and analyzed for luciferase and -gal activity.

Each culture dish is assayed for firefly luciferase activity normalized by β -galactosidase activity to account for differences in transfection efficiency. Luciferase and β -galactosidase activity are measured using a luminometer.

Co-factor recruitment

Ligand-activated PPAR γ induces transcription of target genes through the recruitment of so-called co-factors. It has been shown that different ligands may recruit different sets of co-factors and the set of co-factors recruited by a given ligand determines the biological outcome. Here it has been shown that partial agonists appear to recruit a different set of cofactors, and it has also been suggested that in particular partial agonists recruit a set of co-factor which is desirable from the point of type 2 diabetes treatment. It has been shown that recruitment of the co-factors SRC-1 and PGC-1 α is beneficial, as these co-

factors support the insulin sensitizing effect of PPAR γ without significantly promoting the formation of new fat cells. In contrast most full agonists preferentially recruit TIF2/GRIP-1 and TRAP 220 which promote adipogenesis. I.e. full agonists are associated with a risk of weight gain. Hence, it is important to test the ability of the different ginseng-derived products to preferentially recruit SRC-1 and/or PGC-1 α .

In vitro ADME studies

This part of a pre-clinical development program does not deviate markedly from standard development program, as all relevant safety issues necessary for initiation of the IND process are included. Specific methodologies for each of these steps are not included in this report as they are standard procedures mastered by relevant pre-clinical service providers (toxicology).

Formulation and stability aspects

Once development drug candidates have been identified among ginseng derived compounds, formulation strategy of the final pharmaceutical products should be initiated. This part of the program includes testing of solubility, potential re-synthesis of various salts or the base of the compound. Ideally, the compound shall be stable and readily formulated as a tablet, capsule or similar orally available formulation. The stability of the active pharmaceutical ginseng derivative shall be examined and shelf life at various ambient temperatures determined for the final formulation of the compound. As sensitive and specific assay for detection of the mother compound and its metabolites shall be developed and validated for GLP experiments.

Absorption

Oral bioavailability of the active pharmaceutical ingredient as well as major non-active ingredients shall be tested. Initial experiments address absorption experiments with simple aqueous formulations of the compound but final assessment of oral bioavailability of the final formulation of the compound is inevitable. Initial in vitro studies in Caco-2 cell cultures or similar model will determine whether specific bioactive compounds from ginseng are expected to be orally bioavailable. This part of a development program naturally includes pharmacokinetic analysis of the compound to obtain pre-clinical values for C_{max} , $T_{1/2}$, volume of distribution (Vd/F), protein binding, etc.

Metabolism

The stability of the compound shall be tested in vitro as well as in vivo. The selected ginseng compounds are exposed to hepatic microsome preparations, and S9 assay. Metabolites originating from enzymatic degradation shall be analysed and characterised extensively with HPLC + mass spectrometry, TLC, or similar techniques to assess degree of oxidation, hydroxylation, glucuronide/sulfate conjugation. Pharmacodynamic characterisation of major (more than 5 % of total) metabolites shall be examined in relevant diabetes model. Exposure of the compound to expressed human cytochrome P450 or hepatic microsomes shall be carried out to quantify the most important metabolites. Experiments with P450 isoforms shall help identifying exact route of metabolism and potential drug interactions (CYP2C8, CYP1A1, CYP3A4, etc). Final series of experiments before extensive in vivo studies are commenced will include stability in human and rat plasma

Excretion and elimination

Twenty-four hour sampling of urine and faeces from rats receiving a single dose of the finally formulated compound will determine route(s) of excretion and elimination. Not only will recovery of the active pharmaceutical ingredient and its metabolites depict liver and/or kidneys are major excretions routes, but recovery of metabolites and conjugates will also inspire to design of accompanying safety pharmacology studies.

In vivo studies

Interpretation of aforementioned ***in vitro*** assays is complicated by differences in the ability of a given compound to permeate cell walls. In addition, a number of factors are known to influence PPAR γ activity besides ligand binding. These include phosphorylation of PPAR γ and the presence of coactivator or corepressor proteins. It is not known how well the *in vitro* cell-based assays mimic the *in vivo* expression of these modifying conditions. Thus, there may be a number of reasons why a ginseng derivative with good binding affinity may not have analogous potency in the functional assays; however, the converse is rare. The functional assays are, nevertheless, extremely important in choosing molecules for further progression to *in vivo* assays. There is general consensus that compounds, which have good potency in lipogenesis assays usually, have good antihyperglycaemic and antihyperlipidaemic activity *in vivo* in rodent models of type 2 diabetes. Since adipose tissue is the major site for PPAR γ expression, it is hardly surprising that an assay based on preadipocyte differentiation to adipocytes, a process in which PPAR γ plays a major role will have good predictive value for *in vivo* activity by PPAR γ agonists. However, as will be described later some ginseng compounds are non-adipogenic *in vitro*, and hence may represent therapeutically interesting target molecules as they might be associated with fewer side effects.

Several opportunities exist for testing acute hyperglycaemic efficacy of development compounds acting via stimulation of pancreatic β -cells, intestinal incretin release, or hepatic glucose output. However, compounds acting via improvement of peripheral insulin sensitivity as PPAR γ ligands and metformin have few if any acute effects on glucose homeostasis. Therefore, ***in vivo*** test programs aiming at selecting insulin sensitizing compounds based on their glucose lowering efficacy requires several days of dosing. For already marketed PPAR γ compounds as well as compounds in development, duration of the sub-chronic dosing regime is usually 5-7 days. Before initiating sub-chronic dosing studies of ginseng compounds, initial assessment of absorption, distribution, excretion and metabolism (ADME) should preferably be performed. However, in screening hundreds of ginseng compounds pre-requisite ADME studies are not feasible because they demand for immense analytical capacity. Instead, a twice-daily dosing regime for the 10 most promising compounds should be carried out in the first of studies of the ***in vivo*** program. Only if this effort does not bear fruit, more thorough studies of pharmacokinetic capabilities of individual compounds should be carried out.

Box 6 – Subacute in vivo assay in **db/db mice**

Test compound is administered twice daily to approximately 60-day-old male db/db mice by oral gavage for 7 days. Before starting the experiment, db/db mice are stratified to individual test groups based on fasting blood-glucose levels. In addition to vehicle, four doses of test compound are administered: 3, 10, 50, and 200 mg/kg. Twelve hours before administering the final dose, animals are subjected to an overnight semi-starvation (access to 50 % of normal 24 hour caloric intake). The following morning, animals are subjected to an oral glucose tolerance test 30 minutes after administration of their morning drug dose. Frequent tail blood samples are taken (-10, 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240) and analyzed for plasma glucose, and insulin. Subsequent selection of compounds for further preclinical testing is based on how efficaciously they decrease area under the curve obtained from the OGTT.

Ginseng-derived compounds selected for clinical development for treatment of diabetes and accompanying metabolic disorders should meet two pre-clinical primary end points. These are capacity to lower fasting blood glucose and advanced glycosylation end products (AGEs) usually measured using HbA1c as a surrogate marker. Rodent models characterised by single-gene mutations of the leptin receptor or of leptin are usually used for acute studies as well as chronic studies of anti-hyperglycaemic and lipid lowering capabilities of compounds. Due to defect leptin receptor signalling the **db/db** mouse and the fatty Zucker rat (**fa/fa**) become grossly obese, dyslipidaemic and insulin resistant as adults. The same, though to a lesser extent, is true for the **ob/ob** mouse. Other therapeutically more predictable rodent models of human metabolic syndrome exist, but few rodent models are characterised by elevated HbA1c in addition to insulin resistance.

ADME Screening (at subcontracting analytical laboratory)

After a few ginseng-derived compounds prove superior to other candidates, a thorough ADME test should be carried out as a platform for subsequent selection of lead candidates for chronic dosing studies. Preferably pharmacokinetic data as well as analysis of metabolites and excretion pathways should substantiate selection of lead candidate compatible with a single daily dose. These studies should imply in vitro stability, in vivo kinetics and clearance assessment. They may prove instrumental in subsequent improvements of formulation and delivery (through non-injectible devices).

Chronic study in fatty diabetic Zucker (ZDF) rats

As alluded to above, animal models of type 2 diabetes characterized by elevated levels of HbA1c are not common. Despite its obvious limitations, the ZDF rat comprises the currently most widely used model of type 2 diabetes. Several preclinical development programs for PPAR lead candidates have been carried out meaning that this model is also excellently benchmarked with both pioglitazone and rosiglitazone. Chronic therapy for 4-6 weeks with either of these drugs markedly decrease HbA1c levels and improve oral glucose tolerance.

Glucose tolerance is improved already after 7 days, but to as HbA_{1c} is considered gold standard surrogate variable for long term benefits of antidiabetic treatment, it will be necessary to treat rats for at least 4-6 weeks. The average life span of rat erythrocytes is 60 days. Once a promising compounds have been identified via *in vitro* screening and subsequent *in vivo* subacute testing in *db/db* mice, those being considered lead candidates should be tested for glucose lowering potential in a chronic setting.

Box 7 – Chronic *in vivo* dosage study in ZDF rats

Test compound is administered twice daily to approximately 60-day-old male ZDF rats by oral gavage for 28-42 days. Before starting the experiment, ZDF rats are stratified to individual test groups based on OGTT response curves. ZDF rats are usually 2 months of age, when their diabetes become apparent and they should be monitored for another 4 weeks before starting the dosing regime. At that point of time they have plasma glucose levels around 20 mmol/l and HbA_{1c} values around 12 %. In addition to vehicle, three doses of test compound are administered (actual doses chosen will depend on acute data from *db/db* mouse model). In the course of the study, 24 hour food and water intake as well as body weight is assessed weekly together with baseline plasma-glucose. After 4 weeks treatment, 24 hour glucose and insulin profile is monitored (samples every 4 hours). After 5 weeks treatment, baseline arterial blood pressure is measured using a non-invasive tail cuff method.

After 6 weeks treatment, twelve hours before administering the final dose, animals are subjected to an overnight semi-starvation (access to 50 % of normal 24 hour caloric intake). The following morning, animals are subjected to an oral glucose tolerance test 30 minutes after administration of their morning drug dose. Frequent tail blood samples are taken (-10, 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240) and analyzed for plasma glucose, and insulin. Subsequent selection of compounds for further preclinical testing is based on how efficaciously they decrease area under the curve obtained from the OGTT.

After termination, body fat depots are removed and total body fat and lean body mass is assessed with chemical carcass analysis (very accurate method compared to current imaging techniques)

Chronic study of Ginseng lead candidate in rat model of metabolic syndrome (28 days): After conclusion of subchronic *in vivo* screening studies in *db/db* mice and chronic *in vivo* studies in ZDF rats, one or two of the most promising compounds will be selected for more in depth analysis of therapeutic efficacy in an animal model of metabolic syndrome. One suitable model is the diet-induced obesity rat model; the DIO model. The DIO model owes its obesity to a polygenic background rendering selectively bred Sprague Dawley rats highly prone to diet induced obesity. This is a very realistic mirror of humans suffering metabolic syndrome, as diet induced obese rats develop, glucose intolerance, hyperlipidaemia, visceral adiposity, mild arterial hypertension and hyperinsulinaemia. Besides drug effects on insulin sensitivity and glucose homeostasis, the DIO rat model is suitable for assessing whether selected lead PPAR agonist candidates also have beneficial effects on plasma lipids, arterial hypertension, body composition, as well as food intake and bodyweight. As indicated in the flowchart the studies can be extended by assessment of energy expenditure using in-direct calorimetry.

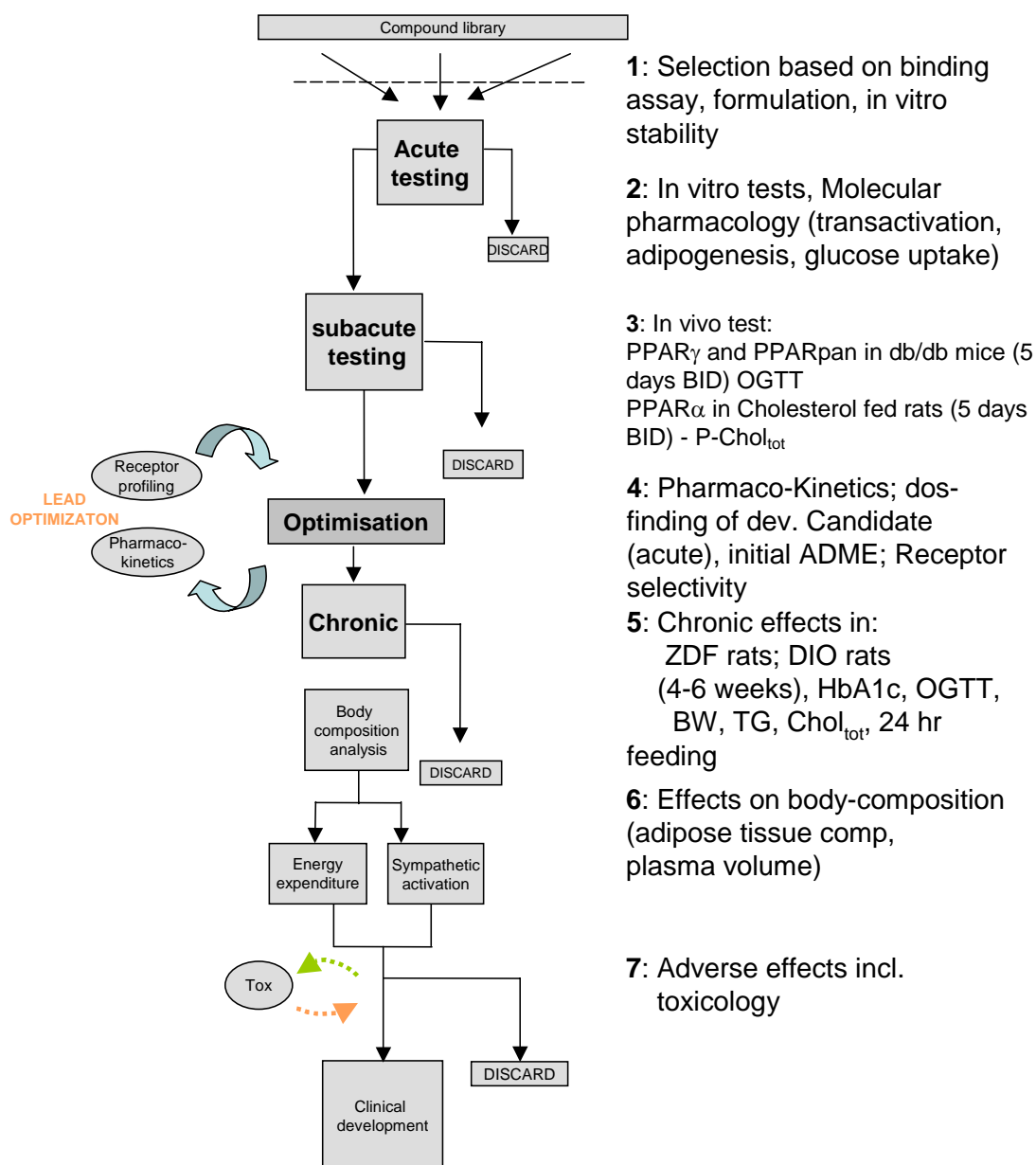
Box 8 – Chronic effects of PPARs on metabolically relevant end points in diet-induced obese (DIO) rats

Batches of forty male diet induced obese (DIO 3 weeks of age) rats are housed individually and acclimated for 7 days. From week 4 to week 10 rats are given high-fat diet (Research Diets, NJ) and water ad libitum. At 10 weeks of age, rats are stratified into four groups by body weight. Dependent on pharmacokinetic data drugs will be administered once or twice daily via gavage. Rats will receive either saline vehicle (n=10) or PPAR agonist (two doses n=10) and reference compound. Food and water intake will be measured daily and body weight will be measured bi-weekly. Plasma samples for insulin, glucose, GLP-1, Amylin, Leptin, glucagon and HbA1c (only at day 28) and lipids, etc will be taken at days 10 and 28 (semi-starved state). On day 24, animals will be subjected to an oral glucose tolerance test (OGTT) where glucose, GLP-1 insulin and glucagon is assessed. At the day of sacrifice (day 28), adipose tissue compartments will be dissected and weighed and together with total carcass analysis accurate estimates of body composition will hereby be obtained. During the entire study, it should be possible to decide whether the compound in question should also be assessed by indirect calorimetry. Relevant tissues (liver, fat, and skeletal muscle can be removed postmortem for analysis of gene expression profiles for PPAR regulated genes).

Euglycaemic hyperinsulinaemic clamp

The gold standard model for final characterisation of glucose lowering agents is the euglycaemic hyperinsulinaemic clamp. Due to its use of dual radioactive glucose tracers, this test allows for assessment of hepatic glucose output (glycogen deposition and degradation) as well as peripheral glucose disposal in specific targets (measuring rate of disappearance in skeletal muscle and adipose tissue compartments). Although these experiments are expensive and time consuming, they give excellent answers to mode and side of action of the drugs in question. Thus, long-term treatment of both men and mice with selective PPAR γ agonists improve hepatic insulin sensitivity in type 2 diabetic subjects.

Drug development flow chart



Toxicology and ADMET studies Subcontracted to GLP certified laboratory:

Once ginseng lead candidates have been identified, and proper toxicology and ADMET studies initiated, a clinical development program should be designed. When designing clinical development programs for antihyperglycaemic drugs, it is pertinent to obtain physiological relevant information along collection of ordinary phase I data (PK/PD). Rather than conducting a conventional phase I study, it is proposed to carry out a phase Ib study on Type 2 diabetes patients to assess anti-diabetic efficacy in the very same population intended to benefit from long term treatment of the drug.

The FDA regards PPAR agonists a special class of anti-diabetic compounds for which specific toxicology studies are required. These special requirements are instigated because PPARs are known to cause various hyperproliferative tissue alterations. In particular transitional epithelial neoplasms have been observed in rodents with most investigational PPAR compounds (also with pioglitazone). Therefore data from 2 year carcinogenicity studies are required before the FDA will approve initiation of clinical phase III programme (ie. More than 6 months of dosing).

Otherwise the toxicology requirements are conventional: A repeated dose toxicity study in two species (one non-rodent) for a minimum duration of 2-4 weeks (Table 1) would support Phase I (Human Pharmacology) and Phase II (Therapeutic Exploratory) studies up to 2 weeks in duration. Beyond this, 1-, 3-, or 6-month toxicity studies would support these types of human clinical trials for up to 1, 3, or 6 months, respectively.

Detailed description of toxicology requirements is available at FDA Web-site:
<http://www.fda.gov/cder/PharmTox/guidances.htm>

References

- A. S. Attele, S. Zhou, Y. Pi. Xie et al. (2002) *Diabetes* **51**, 1851-1858.
- E. Chaput, R. Saladin, M. Silvestre, A.D. Edgar (2000) Fenofibrate and Rosiglitazone Lower Serum Triglycerides with Opposing Effects on Body Weight, Biochemical and Biophysical Research Communications **271**, 445 - 450.
- S. H. Chung, C. G. Choi, S. H. Park (2001) *Arch Pharm Res.* Jun;24(3):214-8.
- K. Hallakou, L. Doare, F. Fougelle, M. Kergoat, M. Guerre-Millo, MF. Berthault, I. Dugail, J. Morin, J. Auwerx, P. Ferre (1997) Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat., *Diabetes*. **46**, 1393 - 1399.
- K. L. Han, H. O. Jung, J. H. Sohn, J-K Hwang (2006) *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 110-113.
- E. Hu, P. Tontonoz, B.M. Spiegelman (1995) Transdifferentiation of Myoblasts by the Adipogenic Transcription Factors PPAR γ and C/EBP α , *PNAS* **92**, 9856 - 9860.
- H. Koutnikova, T.A. Cock, M. Watanabe, S.M. Houten, M.F. Champy, A. Dierich, J. Auwerx (2003) Compensation by the muscle limits the metabolic consequences of lipodystrophy in PPAR hypomorphic mice, *PNAS* **100**, 14457 - 14462.
- N. Kubota, Y. Terauchi, H. Miki, H. Tamemoto, T. Yamauchi, K. Komeda, S. Satoh, R. Nakano, C. Ishii, T. Sugiyama (1999) PPAR Mediates High-Fat Diet-Induced Adipocyte Hypertrophy and Insulin Resistance, *Molecular Cell* **4**, 597 - 609.
- H. Lee, F. J. Gonzalez, M Yoon (2006) *Biochem. Biophys Res. Commun.* **339**, 196-203.

- P.D.G. Miles, Y. Barak, R.M. Evans, J.M. Olefsky (2003) Effect of heterozygous PPAR γ deficiency and TZD treatment on insulin resistance associated with age and high-fat feeding, *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**, E618 - E626.
- C. Nugent, J.B. Prins, J.P. Whitehead, D. Savage, J.M. Wentworth, V.K. Chatterjee, S. O'Rahilly. (2001). Potentiation of glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes by PPAR γ agonists is maintained in cells expressing a PPAR γ dominant-negative mutant: evidence for selectivity in the downstream responses to PPAR γ activation. *Mol Endocrinol.* **15**, 1729-38.
- A. Okuno, H. Tamemoto, K. Tobe, K. Ueki, Y. Mori, K. Iwamoto, K. Umesono, Y. Akanuma, T. Fujiwara, H. Horikoshi, Y. Yazaki, T. Kadowaki (1998) Troglitazone Increases the Number of Small Adipocytes without the Change of White Adipose Tissue Mass in Obese Zucker Rats, *J. Clin. Invest.* **101**, 1354 – 1361
- M-Y. Park, K-S. Lee, M-K. Sung. *Life Sci.* 2005 26. 3344-54.
- E.D. Rosen, P. Sarraf, A.E. Troy, G. Bradwin, K. Moore, D.S. Milstone, B.M. Spiegelman, R.M. Mortensen (1999) PPAR[γ] Is Required for the Differentiation of Adipose Tissue In Vivo and In Vitro, *Molecular Cell* **4**, 611 - 617.
- C.J. de Souza, M. Eckhardt, K. Gagen, M. Dong, W. Chen, D. Laurent, B.F. Burkey, Effects of Pioglitazone on Adipose Tissue Remodeling Within the Setting of Obesity and Insulin Resistance, *Diabetes* 50 (2001) 1863 - 1871.
- S.R. Tafuri, (1996). Troglitazone enhances differentiation, basal glucose uptake, and Glut1 protein levels in 3T3-L1 adipocytes. *Endocrinology* **137**, 4706-12.
- P. De Vos, A.M. Lefebvre, S.G. Miller, M. Guerre-Millo, K. Wong, R. Saladin, L.G. Hamann, B. Staels, M.R. Briggs, J. Auwerx, Thiazolidinediones Repress ob Gene Expression in Rodents Via Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ , *J. Clin. Invest.* **98** (1996) 1004 - 1009.
- V Vuksan, J. L. Sivenpiper, Z. Xu et al. (2001) *J Am Coll Nutr.* **20**, 370S-380S
- X. Wu, Y. Xie, N.L. Bucher, S.R. Farmer (1995) Conditional ectopic expression of C/EBP β in NIH-3T3 cells induces PPAR γ and stimulates adipogenesis., *Genes Dev.* **9**, 2350 - 2363.
- G.Y. Yeh, D.M. Eisenberg, T.J Kaptchuk, R.S Phillips (2003) *Diabetes Care* **26**, 1277-1294.

Analyse af ginsengekstrakter og ginsenosider med muligt potentiale for udvikling af nye antidiabetiske farmaka

Karsten Kristiansen, Lise Madsen, Rasmus Koefoed Petersen, Hongbin Zhang og Lars Porskjær Christensen

Correspondence:

Karsten Kristiansen
University of Southern Denmark
Dep. Of Biochemistry and Molecular Biology
Campusvej 55, 5230 Odense M, Denmark
Direct dial: (+45) 65 50 24 08
Fax: (+45) 65 50 24 67
E-mail: kak@bmb.sdu.dk

Formålet med denne rapport er:

- at opsummere de resultater, der er opnået gennem de hidtidige analyser af ginseng ekstrakter og rene ginsenosider, der er i forbindelse med dette projekt er modtaget fra henholdsvis Danmarks JordbrugsForskning, Afdelingen for Fødevarevidenskab, Årsløv, og fra Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kina
- at indikere hvilke stoffer/ekstrakter, der på baggrund af de gennemførte analyser har et potentiale for en fremtidig udvikling af nye antidiabetiske farmaka, og derfor vil være af interesse for videre undersøgelser (resultater holdt fortrolige)
- at anføre hvilke analyser, der bør foretages i en videreførelse af dette projekt

Introduktion

Fedme og fedmerelaterede sygdomme er i hastig fremvækst i hele verden. Perspektiverne er alvorlige, idet de fedmerelaterede sygdomme omfatter almindelige sygdomme som hjerte-kar-sygdomme, type 2 diabetes (gammelmands sukkersyge) og visse kræftformer. Den omsiggribende antagelse af en vestlig amerikaniseret livsform med overindtag af føde kombineret med nedsat fysisk aktivitet har bevirket, at fedme i dag har antaget en epidemisk proportion i hele verden. I dag er ca. 2/3 af den amerikanske befolkning overvægtige, og ca 1/3 må betegnes som decideret fede (BMI>30).

I praksis har det vist sig nærmest umulig, at stoppe denne udvikling og dermed også mindste stigningen i patienter, der lider af type 2 diabetes. På verdensplan regnes med en stigning på 43 % i perioden 2000-2010, og den højeste stigningstakt findes i Sydamerika, Afrika og Sydøst Asien.

Der er derfor et fortsat og stigende behov for at behandle fedme og fedmens følgesygdomme, specielt type 2 diabetes. Det grundlæggende problem i type 2 diabetes er organismens nedsatte følsomhed overfor insulin. I starten af sygdomsforløbet kompenserer organismen for den nedsatte følsomhed ved at udskille øgede mængder insulin fra bugspytkirtlen, men med tiden kan produktion ikke følge trit med behovet og blodets indhold af sukker stiger. I dag anvendes i udstrakt grad såkaldte thiazolidioner i behandlingen af type 2 diabetes. Disse stoffer øger organismens følsomhed overfor insulin. For 11 år siden blev det vist, at thiazolidioner binder til og aktiverer en såkaldt nuclear receptor kaldet Peroxisom Proliferator-Aktiveret Receptor gamma (PPAR). I dag er to typer af thiazolidioner markedsført til behandling af type 2 diabetes, og salget forventes i 2006 at runde 8.5 milliarder USD på verdensplan. Problemet med de markedsførte produkter er imidlertid, at der er alvorlige bivirkninger. Ødemdannelse, effekter på hjerte og skeletmuskler og øget dannelse af fedtvæv. Denne sidste effekt er desværre en naturlig konsekvens af at aktivering af PPAR er signalet, der initierer omdannelse af fibroblastlignende celler (bindevævsceller) til fedtceller. Dette har i de forløbne år afstedkommet et kæmpe udviklingsarbejde i en lang række globale farmaceutiske virksomheder for at udvikle nye typer af PPAR aktivatorer, som øger insulinfølsomheden, men ikke giver de overfor nævnte bivirkninger, heriblandt stimulering af fedtcelleudvikling. Hidtil har dette arbejde ikke været udtalt succesfuldt, og mange nye produkter er blevet trukket tilbage/stoppet i udviklingsfasen. Der er således stadig et meget stort udækket behov for nye medikamenter til behandling af type 2 diabetes.

Mange forskellige planter betegnes ofte som ginseng. Disse planter inkluderer kinesisk eller koreansk ginseng (*Panax ginseng*), siberisk ginseng (*Eleutherococcus senticosus*), amerikansk ginseng (*Panax quiquefolius*) og japansk ginseng (*Panax japonicus*). I dette projekt er vægten lagt på kinesisk og amerikansk ginseng. Der er næppe nogen sygdom eller dårligdom, hvor det ikke er hævdet, at ginseng har en gunstig effekt. I forhold til diabetes, specielt type 2 diabetes, er der gennem de seneste år publiceret en række arbejder, der klart indicerer/dokumenterer, at i al fald nogle ginseng preparationer indeholder stoffer, som har potentiel interesse som udgangspunkt for udviklingen af nye antidiabetiske farmaka (for en oversigt se, Yeh et al., 2003). Det blev således for nyligt rapporteret, at ginsenosidet 20(S)-protopanaxatriol, en aglycon af ginsenosidet Rg₂, aktiverer PPAR i 3T3-L1 celler (Han et al., 2006). Ekstrakter af *Panax ginseng* bær og ginsenosidet Re er blevet rapporteret, at have antidiabetisk effekt i *ob/ob* mus (Attele et al 2002), og oral administration af hvid ginseng rod (Ginseng Radix Alba, GRA) og smårødder af Ginseng Radix Palva, GRP fører til en opregulering af udtrykket af PPAR proteinet (Chung et al., 2001). Koreansk rød ginseng og banba er blevet vist, at øget udtrykket af PPAR α i leveren og PPAR i fedtvæv i mus (Park et al., 2005).

Konjac-mannen ginseng er blevet rapporteret, at øge insulinfølsomheden og amerikansk ginseng er vist at øge insulinsekretion (Vuksan 2001). Endelig skal det nævnes, at test af 8 hovedginsenosider viste, at ginsenosidet Rf er det ginsenosid der mest potent aktiverer PPAR α (Lee et al., 2006), en aktivitet, der indirekte kan øge insulinfølsomheden ved at sænke plasma triglycerider pga en øget fedtforbrænding i leveren.

Som beskrevet ovenfor synes ginseng ekstrakter og/eller stoffer isoleret fra ginseng, at udgøre interessante udgangspunkter for udviklingen af nye antidiabetiske farmaka. I dette projekt har vi analyseret forskellige ginseng ekstrakter fremstillet ved Danmark JordbrugsForsknings afdeling i Årsløv. I tillæg har vi analyseret en række renfremstillende stoffer isoleret fra ginseng ved Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Kina. Da stoffer, der aktiverer PPAR uden at stimulerer dannelse af nye fedtceller er lovende udgangspunkter, har vi testet ekstrakterne for deres evne til at aktivere PPAR og stimulere/ikke stimulere dannelsen af fedtceller. Baseret på vort tidligere arbejde vedrørende regulering af PPAR aktivitet har vi udviklet et højfølsomt transaktiveringsassay. I dette assay benytter vi musefibroblaster isoleret fra musefostre, hvori genet, der koder for retinoblastoma proteinet, er inaktiveret. Da vi har vist, at retinoblastoma proteinet virker undertrykkende på aktiviteten af PPAR giver brugen af celler, der mangler dette protein en meget høj følsomhed i assayet. For at undersøge ekstrakternes/stoffernes evne til at stimulerer fedtcelledannelsen har vi modificeret det traditionelle 3T3-L1 preadipocytdifferentierings-assay. Vi har vist disse celler ikke differentierer til fedtceller, når de dyrkes i føtal kalve serum med dexamethason, med mindre et stof, der aktiverer PPAR (en PPAR agonist) adderes. For at undersøge om nogle ekstrakter direkte hæmmer udviklingen af nye fedtceller, stimulerer vi 3T3-L1 preadipocytter med en cocktail, der normalt stimulerer dannelsen af fedtceller i nærvær af ginsengekstrakterne/stofferne. Differentiering af fedtceller detekteres ved at farve fedt med oil-red-O. I den vedlagte rapport "Identification, characterization and pre-clinical development of compounds from ginseng with potential anti-diabetic effects" er i detaljer beskrevet, hvorledes det samlede screeningsprogram er opbygget og planlagt.

Materialer og Metoder

Preparation af ginsengekstrakter

Ginseng rødder:

77,7 g ginseng rødder blev findelt og homogeniseret yderligere med en Ultra-Turrax T25 i 1 min sammen med 200 ml *n*-hexan. Efter henstand natten over i kølerum (5°C) blev hexanekstraktet dekanteret fra ved filtrering igennem et filtrerpapir. Herefter blev der tilsat 200 ml dichlormethan til plantematerialet og efter henstand natten over i kølerum (5°C) blev dichlormethanekstraktet dekanteret fra ved filtrering, hvorefter det blev tilsat 200 ml methanol til plantematerialet efterfulgt af ekstraktion natten over i kølerum (5°C) og dekantering af methanolekstraktet ved filtrering. Til sidst blev ginseng rødderne ekstraheret med 200 ml vand efter samme procedure som beskrevet ovenfor.

Ca. 1.5 ml af de enkelte ekstrakter blev herefter sendt direkte til testning men da dette ikke gav noget resultat (se Resultatafsnittet) blev ekstrakterne opkoncentreret ved inddampning til 10 ml og ca. 1.5 ml af de opkoncentrerede ekstrakter blev herefter testet igen i de forskellige bioassays som beskrevet nedenfor.

Ginseng pulp (bær)

182,8 g ginseng pulp blev homogeniseret med en Ultra-Turrax T25 i 1 min sammen med 200 ml *n*-hexan. Efter henstand natten over i kølerum (5°C) blev hexanekstraktet dekanteret fra ved filtrering igennem et filtrerpapir. Herefter blev der tilsat 200 ml dichlormethan til pulpen og efter henstand natten over i kølerum (5°C) blev dichlormethanekstraktet dekanteret fra ved filtrering, hvorefter det blev tilsat 200 ml methanol til pulpen efterfulgt af ekstraktion natten over i kølerum (5°C) og dekantering af methanolekstraktet ved filtrering. Til sidst blev pulpen ekstraheret med 200 ml vand efter samme procedure som beskrevet ovenfor. Ca. 1.5 ml af de enkelte ekstrakter blev herefter sendt direkte til testning men da dette ikke gav noget resultat (se Resultatafsnittet) blev ekstrakterne opkoncentreret ved inddampning til 10 ml og ca. 1.5 ml af de opkoncentrerede ekstrakter blev herefter testet igen i de forskellige bioassays som beskrevet nedenfor.

Cellekultur

ME3 celler dyrkes i Dulbeccos modified Eagle's media (DMEM) suppleret med 10 % kalve serum (CS) og antibiotika (62.5 g/ml penicillin og 100 g/ml streptomycin). Celler blev udsået i 24 brøndsplade og transfekteret, når brøndene var 50-70 % confluent.

Transfection

ME3 celler blev transfekteret med Metafectene (Biontex) essentielt som anbefalet af producenten. Kort: for hver brønd i en 24 brøndsplade anvendtes totalt 0.35 g DNA (0.2 g Gal4-responsive luciferase reporter 4xUAS-TK-Luc, 0.1 g plasmid kodende for en fusion mellem Gal4 DNA-bindingsdomænet og det ligandbindende domæne af human PPAR- δ eller - γ , og 0.05 g CMV- β -galactosidase normaliserings-vektor (Clontech)), som blev fortyndet i 30 l DMEM og blandet med 1 l Metafectene fortyndet i 30 l DMEM. Efter 20 min. inkubation blev DNA/lipid blandingen sat til cellerne. 6 h senere blev mediet skiftet til DMEM suppleret med antibiotika samt enten en positiv kontrol (1 M rosiglitazone for hPPAR γ -LBD eller 1 M L165041 for hPPAR δ -LBD), opløsningsmiddel eller teststof eller ekstrakt. Alle ekstrakter og rene stoffer blev testet i 3 koncentrationer som anført i figurerne. 18 h senere blev cellerne høstet i 100l lysis buffer og luciferase and β -galactosidase aktiviteter blev bestemt i et Berthold MicroLumat LB96P luminometer. Alle forsøg blev udført i triplikater og målt i duplikater.

Differentiation med dexamethasone

3T3-L1 celler blev dyrket i Dulbeccos modified Eagle's media (DMEM) suppleret med 10 % kalveserum og antibiotika (62.5 g/ml penicillin og 100 g/ml streptomycin). Cellerne blev udsået i 24 brøndsplader og cellerne blev dyrket til de var confluent. To dage efter celler var confluent (betegnes som dag 0) blev celler induceret til, at undergå adipocytdifferentiering med DMEM suppleret med 10 % føtalt kalve serum (FBS), antibiotika, 1 μ M dexamethasone (Sigma), positive kontrol (1 M rosiglitazone), opløsningsmiddel eller test-ekstrakt eller -stof. Ekstrakter blev testet i 1, 10, and 100 gange

fortynding og rene stoffer blev testet i 3 forskellige koncentrationer (0.1, 1.0 og 10 M). Alle forsøg blev udført i triplikat. Efter 48 h blev cellerne skiftet til DMEM suppleret med 10 % FBS, positiv kontrol, opløsningsmiddel eller testekstrakt/stof. Fra dag 4 bestod mediet af DMEM med 10 % FBS og antibiotika. Mediet blev skiftet hver anden dag indtil dag 8.

På dag 8 blev cellerne vasket i PBS og fixeret i 3.7 % formaldehyd i 1 h. Cellulære triacylglyceroler blev farvet med Oil Red O (0.5 g Oil Red O (Sigma) i 100 ml isopropanol, fortyndet 6:4 med vand) i 1 h. Efter farvning blev brøndene vasket to gange i vand og dernæst fotograferet.

Differentiation with MDI

3T3-L1 celler blev dyrket i Dulbeccos modified Eagle's media (DMEM) suppleret med 10 % kalveserum og antibiotika (62.5 g/ml penicillin og 100 g/ml streptomycin). Cellerne blev udsået i 24 brøndplader og cellerne blev dyrket til de var confluent. 2 dage efter celler var confluent (betegnes som dag 0) blev celler induceret til at undergå adipocytdifferentiering med DMEM suppleret med 10 % føtalt kalve serum (FBS), antibiotika, 1 µM dexamethasone (Sigma), 0.5 mM isobutylmethylxanthin (Aldrich), 1g/ml insulin (Sigma), positiv kontrol (1 M rosiglitazone), opløsningsmiddel eller testekstrakt eller -stof. Ekstrakter blev testet i 1, 10, and 100 gangs fortynding og rene stoffer blev testet i 3 forskellige koncentrationer (0.1, 1.0 og 10 M). Alle forsøg blev udført i triplikat. Efter 48 h blev cellerne skiftet til DMEM suppleret med 10 % FBS, 1 g/ml insulin, positiv kontrol, opløsningsmiddel eller testekstrakt/stof. Fra dag 4 bestod mediet af DMEM med 10 % FBS og antibiotika. Mediet blev skiftet hver anden dag indtil dag 8.

På dag 8 blev cellerne vasket i PBS og fixeret i 3.7 % formaldehyd i 1 h. Cellulære triacylglyceroler blev farvet med Oil Red O (0.5 g Oil Red O (Sigma) i 100 ml isopropanol, fortyndet 6:4 med vand) i 1 h. Efter farvning blev brøndene vasket to gange i vand og dernæst fotograferet.

Yderligere information

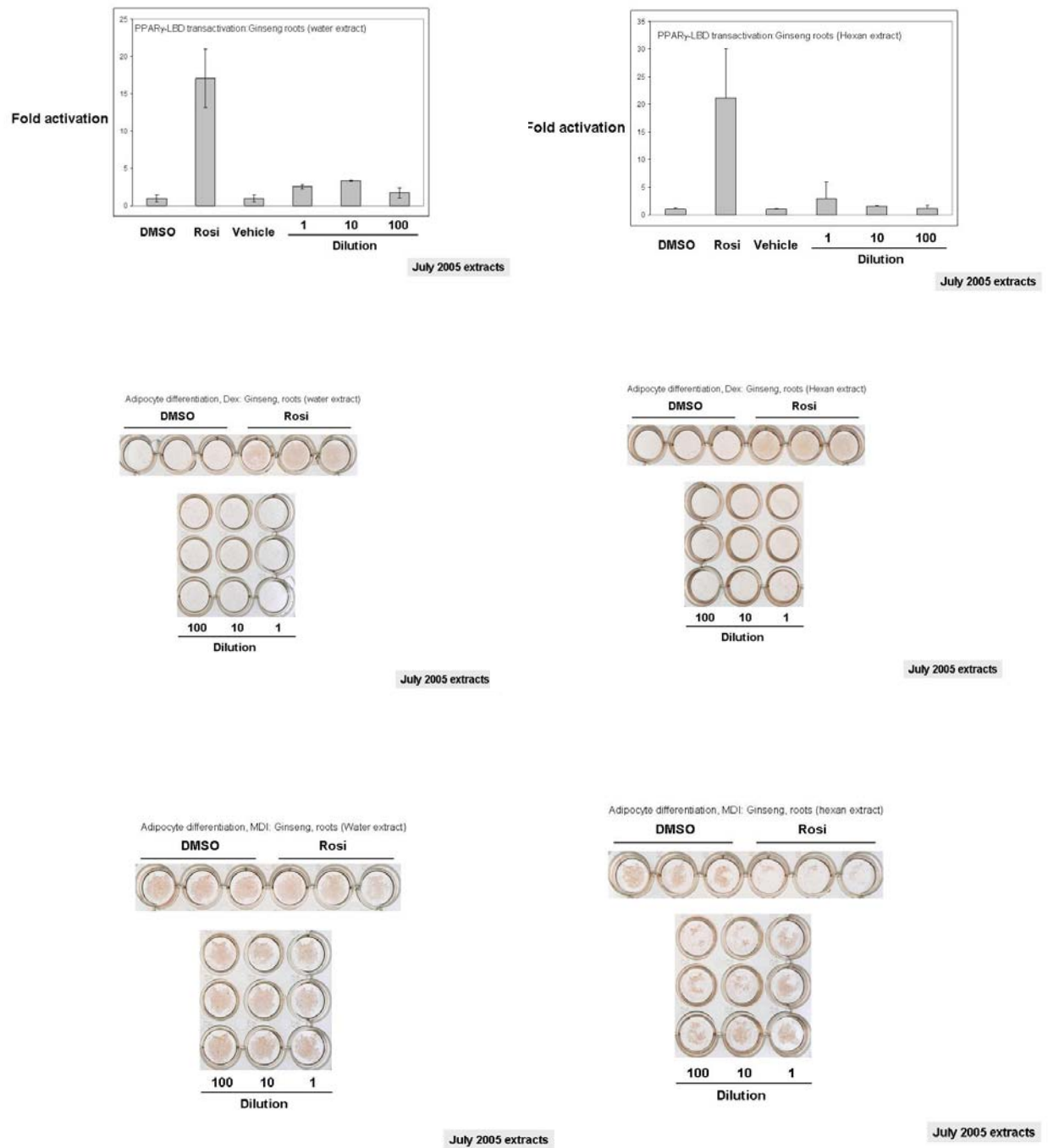
I annex 1 er anført de prøver, der er analyseret på i skemaform. I annex 2 er DJF prøvernes formulering angivet.

I annex 3 er anført strukturer for de ginsenosider, der er modtaget fra Kunming Institute of Botany, Kunming, Kina.

Resultater

Analyse af ginseng ekstrakter

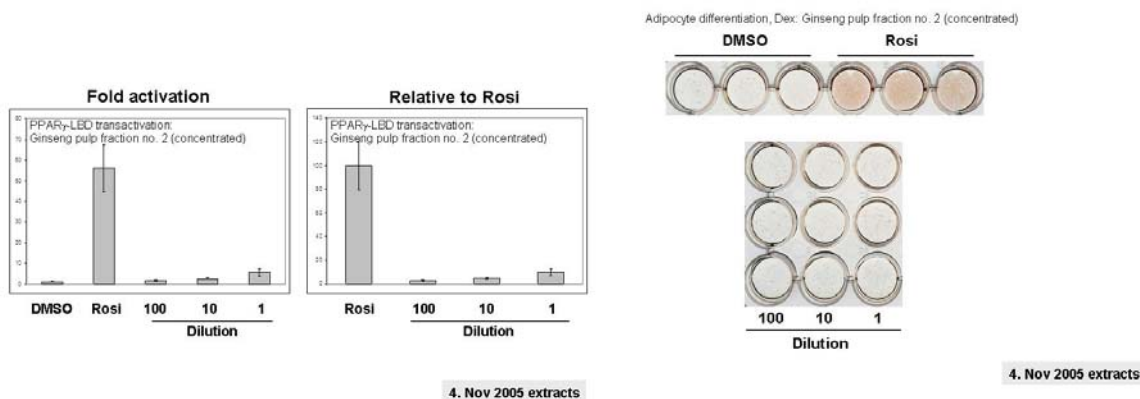
Alle ekstrakter blev analyseret for deres evne til at aktivere PPAR i transiente tranfektionsforsøg og deres evne til at påvirke dannelsen af nye fedtceller (adipocytter).



Figur 8.1. Analyse af ginseng ekstrakter

De først modtagne ekstrakter var ikke tilstrækkeligt koncentrerede, og derfor blev mere koncentrerede ekstrakter fremstillet og testet. I alt blev 12 forskellige typer af ekstrakter analyseret.

I det følgende gennemgås de mest interessante positive fund.



Figur 8.21. Analyse af ginseng bær

I vandige ekstrakter af ginseng rod og i ginseng pulp fandtes tydeligt stoffer, der var i stand til at aktivere PPAR. Det samme var tilfældet i hexan ekstrakter.

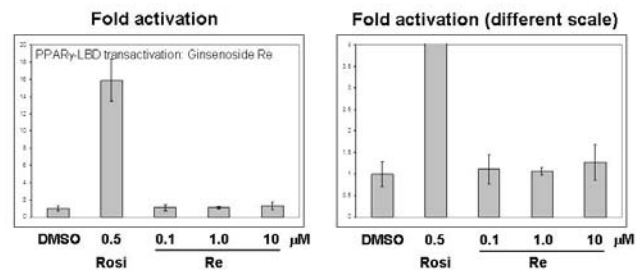
På trods af denne aktivitet havde ingen af ekstrakterne en stimulerende effekt på fedtcelledifferentiering; ses ved at oil-red-o farvningen af behandlede celler ikke er større end den der ses for de celler der blot er behandlet med det rene opløsnings-middel.

De videre undersøgelser af ginseng ekstrakterne

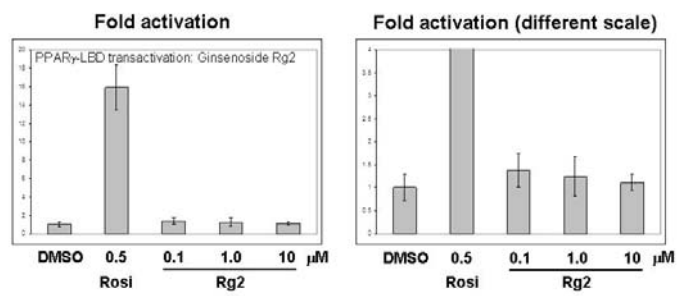
Evnen til at aktivere PPAR uden samtidigt at stimulere fedtcelledannelse er netop de indledende karakteristika, der indikerer, at disse ekstrakter indeholder stoffer, der vil være interessante at undersøge nøjere. Det bliver her nødvendigt, at foretage bioassay-guidede fraktioneringer af de tre udvalgte ekstrakter, for nærmere at kunne identificere hvilke stoffer, der har den ønskede PPAR aktiverende egenskab. I den sammehæng er det vigtig at holde for øje, at ekstrakterne med stor sandsynlighed indeholder en lang række af bioaktive stoffer, og det er absolut muligt, at den PPAR stimulerende aktivitet skyldes et stof og at andre stoffer i ekstrakterne er ansvarlige for undertrykkelsen af den stimulerende effect af PPAR agonister på fedtcelledannelse.

Analyse af isolerede ginsenosider

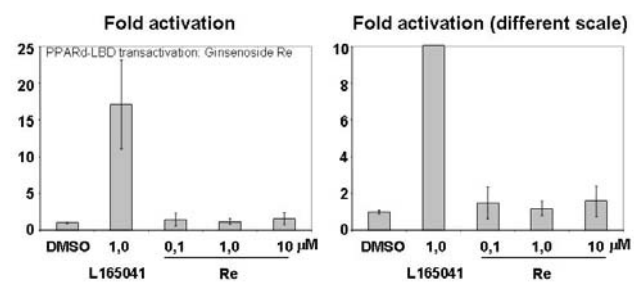
Med hensyn til de oprensede stoffer, der blev modtaget fra Kunming Institute of Botany viste analyserne, at flere enkeltginsenosider er i stand til at aktivere PPAR. Ingen af disse ginsenosider virkede som PPAR δ agonister, og ingen fandtes at stimulere fedtcelledannelse. Disse ginsenosider er således i lighed med de generelle ekstrakter omtalt ovenfor af potential interesse mht yderligere undersøgelser. Navnet på de tre ginsenosider holdes fortroligt indtil videre.



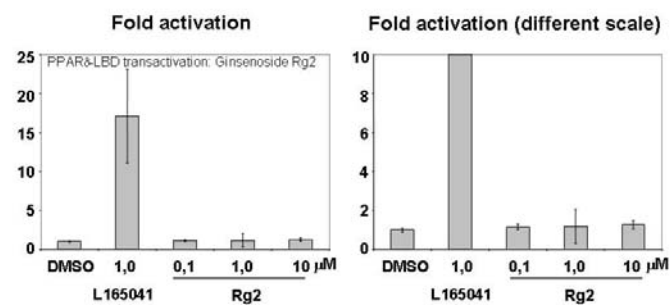
Chen extracts



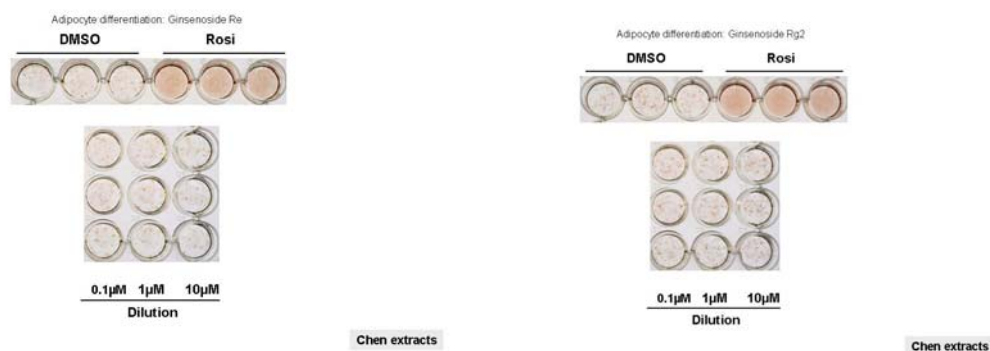
Chen extracts



Chen extracts



Chen extracts



Figur 8.3. Analyse af ginsenosiderne Re og Rg2 vist som eksempel for metoden

Ginsenosidet Re var tidligere rapporteret, at have en antidiabetisk effekt i ob/ob mus. I vore transaktiveringsassay fandtes ingen aktivering af hverken PPAR eller PPAR δ , ligesom Re ikke stimulerede fedtcelledannelse. Umiddelbart kan der anføres to mulige forklaringer. 1) den antidiabetiske effekt i mus er PPAR uafhængig, eller 2) fraspaltning af sukkerdelen er nødvendig for, at stoffet kan aktivere PPAR og udøve sin antidiabetiske effekt. Den manglende aktivering af PPAR med ginsenosidet Rg2 antyder, at den sidste forklaring kan være rigtig. Aglykonet af Rg2 ser nemlig ud til, at kunne aktivere PPAR i 3T3-L1 celler, hvorimod ginsenosidet Rg2 tydeligvis ikke er i stand til, at aktivere hverken PPAR eller PPAR δ . Ligeledes har det ingen effekt på adipocytdifferentiering af 3T3-L1 celler.

De videre undersøgelser af ginsenosiderne

Den videre undersøgelse af de aktive ginsenosider vil omfatte:

- Analyse af aktivitet overfor PPAR α (PPAR α aktivering er uønsket i forhold til FDA).
- Direkte bindingsanalyser (test at ginsenosidet kan binde direkte til ligandbindingsdomænet af PPAR)
- Evnen til at stimulere insulinafhængig glucose optag i fedtceller.
- Karakterisering mht om ginsenosidet er en partiel PPAR agonist (ønskværdig).
- Cofaktor rekruttering (undersøgelse om ginsenosidet fortrinsvis rekrutterer såkaldte gunstige cofaktorer).

For ginsenosiderne vil det endvidere blive undersøgt om fraspaltning af sukkerdelen ændrer aktiviteten, og hvis dette er tilfældet skal de aktive komponenter gennem samme screeningsprotokol. Der henvises i øvrigt til rapporten "Identification, characterization and pre-clinical development of compounds from ginseng with potential anti-diabetic effects", hvori rationale for screeningsstrategien er nøjere beskrevet.

Konklusion

De gennemførte analyser har påvist, at stoffer i vand- og hexan-ekstrakter fra ginseng rod har egenskaber, der gør dem interessante i forbindelse med yderligere undersøgelse af deres mulige antidiabetiske effekter. Det samme er tilfældet for de indtil videre fortrolige aktive enkelt ginsenosider. Det vil endvidere være af interesse, at undersøge om fraspaltning af sukker vil øge aktiviteten overfor PPAR og dermed muligvis øge den potentielle antidiabetiske effekt. De positive vand- og hexan-ekstrakter skal fraktioneres ved hjælp af forskellige kromatografiske metoder for om muligt, at identificere de aktive komponenter. Rationalet for de videre analyser er beskrevet i detaljer i rapporten: "Identification, characterization and pre-clinical development of compounds from ginseng with potential anti-diabetic effects".

Referencer

- A. S. Attele, S. Zhou, Y. Pi. Xie et al. (2002) Antidiabetic effects of Panax ginseng berry extract and identification of an effective component. *Diabetes* **51**, 1851-1858.
- S. H. Chung, C. G. Choi, S. H. Park (2001) Comparison between white ginseng radix and rootlet for antidiabetic activity and mechanism in KKAY mice. *Arch Pharm Res.* **24**, 214-218.
- K. L. Han, H. O. Jung, J. H. Sohn, J-K Hwang (2006) Ginsenoside 20(S)-protopanaxatriol (PPT) activates Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR γ) in 3T3-L1 adipocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **29**, 110-113.
- H. Lee, F. J. Gonzalez, M Yoon (2006) Ginsenoside Rf, a component of ginseng, regulates lipoprotein metabolism through peroxisome proliferator-activated receptor α . *Biochem. Biophys Res. Commun.* **339**, 196-203.
- M-Y. Park, K-S. Lee, M-K. Sung (2005) Effects of dietary mulberry, Korean red ginseng and banaba on glucose homeostasis in relation to PPAR- α , PPAR- γ , and LPL mRNA expression. *Life Sci.* **26**, 3344-54.
- V Vuksan, J. L. Sivenpiper, Z. Xu et al. (2000) American ginseng improves glycemia in individual with normal glucose tolerance: Effect of dose and time escalation. *J Am Coll Nutr.* **20**, 370S-380S
- G.Y. Yeh, D.M. Eisenberg, T.J Kaptchuk, R.S Phillips (2003) Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care* **26**, 1277-1294.

Annex 1 Oversigt over ginseng ekstrakter og rene stoffer

Årslev – første prøver

Sample	Extraction	Placement	Comments
Roots (U004)	Dichlormethan (D)	4° -basement	
	Hexan (H)	4° -basement	
	Methanol (M)	4° -basement	
	Water (W)	4° -basement	
Berry (U003)	Dichlormethan (D)	4° -basement	
	Hexan (H)	4° -basement	
	Methanol (M)	4° -basement	
	Water (W)	4° -basement	

Årslev (mere koncentrerede ekstrakter)

Sample	Extraction	Placement	Comments
Roots	Dichlormethan (D)		
	Hexan (H)		
	Methanol (M)		
	Water (W)		
Berry	Dichlormethan (D)		
	Hexan (H)		
	Methanol (M)		
	Water (W)		

Årslev – bær prøver

Sample	Extraction	Placement	Comments
Fruit	Ethylacetate	4° -basement	
	Water (pellet from ethylacetate extract)	4° -basement	
	Methanol	4° -basement	
	Juice (pressed fruit)	4° -basement	
	Water (1. concentrate)	4° -basement	
	Water (2. concentrate)	4° -basement	
	Water (3. concentrate)	4° -basement	

Fruit peel	Ethylacetate	4° -basement
	Water (pellet from ethylacetate extract	4° -basement
	Methanol	4° -basement

Kunming Institute of Botany – rene stoffer

Sample	Mol. Wt.	Placement	Comment
20 (R)-Ginsenoside Rg3	785.01	-20 Freezer (MN)	
20 (S)-Ginsenoside Rg3	785.01	-20 Freezer (MN)	
As-a (asiatic acid	472.60	-20 Freezer (MN)	
As-c (madecassosic acid)	488.70	-20 Freezer (MN)	
Beberine	336.35 (+36.5)	-20 Freezer (MN)	
Euscaphic acid	?	-20 Freezer (MN)	
Ginsenoside Rb1	1109.29	-20 Freezer (MN)	
Ginsenoside Rb3	1079.27	-20 Freezer (MN)	
Ginsenoside Rd	947.15	-20 Freezer (MN)	
Ginsenoside Re	947.15	-20 Freezer (MN)	
Ginsenoside Rg1	801.01	-20 Freezer (MN)	
Ginsenoside Rg2	785.01	-20 Freezer (MN)	
Ginsenoside Rh1	638.87	-20 Freezer (MN)	
Ginsenoside Rh4	620.86	-20 Freezer (MN)	
Jx-1 (madecassoside)	975.12	-20 Freezer (MN)	
Kaji-ichifoside F-1	648.87	-20 Freezer (MN)	
Notoginsenoside R1	933.13	-20 Freezer (MN)	
Notoginsenoside R2	770.99	-20 Freezer (MN)	
Notoginsenoside Rw-5	656.89	-20 Freezer (MN)	
Notoginsenoside T	1343.50	-20 Freezer (MN)	
Rosamultin	648.87	-20 Freezer (MN)	
-ecdysone	480.63	-20 Freezer (MN)	

Annex 2 Extrakter af ginseng bær til testning

Ginseng fruit. Juice pressed from whole fruit:

Pulp filtered (volume 118 ml water extract). The water extract was concentrated to 15 ml, analysed and delivered for testing.

Ginseng pulp fraction no. 1 (concentrated):

Pulp filtered (volume 610 ml water extract). The water extract was concentrated to 26.5 ml, analysed and delivered for testing.

Ginseng pulp fraction no. 2 (concentrated):

Pulp filtered (volume 445 ml water extract). The water extract was concentrated to 13 ml, analysed and delivered for testing.

Ginseng pulp fraction no. 3 (concentrated):

Pulp filtered (volume 375 ml water extract). The water extract was concentrated to 10 ml, analysed and delivered for testing.

Ethyl acetate and methanol extract of whole ginseng fruit and water extract of precipitate from the ethyl acetate extract (3 different extracts):

91 g whole ginseng fruit (frozen) was extracted with 150 ml and 100 ml ethyl acetate, respectively, followed by extraction with 150 ml and 100 ml 80 % methanol, respectively.

Ethyl acetate extract of ca. 250 ml was concentrated *in vacuo* (30°C) to dryness and re-dissolved in 5 ml ethyl acetate. The concentrated ethyl acetate extract was analysed for polyacetylenes/ginsenosides and delivered for testing.

A red precipitate from the ethyl acetate extract was dissolved in 5 ml water (not soluble in ethyl acetate). This extract corresponds to **water extract of precipitate from the ethyl acetate extract of whole ginseng fruit** and delivered for testing.

The methanol extract of ca. 250 ml was concentrated *in vacuo* (30°C) to dryness and re-dissolved in 10 ml 80 % methanol. The concentrated methanol extract was analysed for polyacetylenes/ginsenosides and delivered for testing.

Ethyl acetate and methanol extract of peels from ginseng fruits and water extract of precipitate from the ethyl acetate extract (3 different extracts):

98 g peels from ginseng fruits (frozen) were extracted with 150 ml and 100 ml ethyl acetate, respectively, followed by extraction with 150 ml and 100 ml 80 % methanol, respectively.

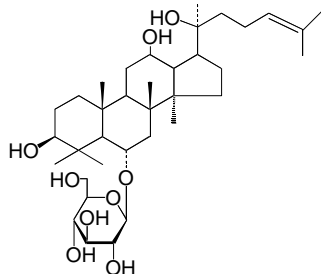
Ethyl acetate extract of ca. 250 ml was concentrated *in vacuo* (30°C) to dryness and re-dissolved in 5 ml ethyl acetate. The concentrated ethyl acetate extract was analysed for polyacetylenes/ginsenosides and delivered for testing.

A red precipitate from the ethyl acetate extract was dissolved in 5 ml water (not soluble in ethyl acetate). This extract corresponds to **water extract of precipitate from the ethyl acetate extract of peels of ginseng fruits** and delivered for testing.

The methanol extract of ca. 250 ml was concentrated *in vacuo* (30°C) to dryness and re-dissolved in 10 ml 80 % methanol. The concentrated methanol extract was analysed for polyacetylenes/ginsenosides and delivered for testing.

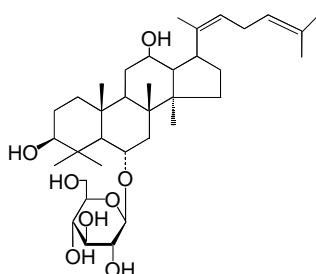
Annex 3. Kemiske strukturer af ginsenosider modtaget fra Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences.

Information for ginsenosides and analogs:



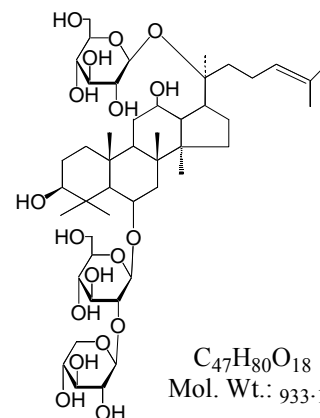
$C_{36}H_{62}O_9$
Mol. Wt.: 638.87

ginsenoside Rh1



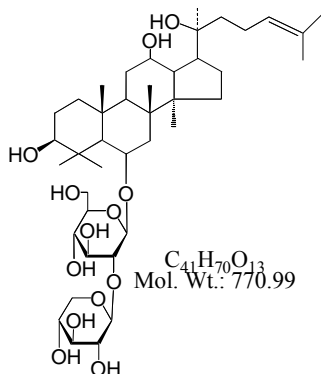
$C_{36}H_{60}O_8$
Mol. Wt.: 620.86

ginsenoside Rh4



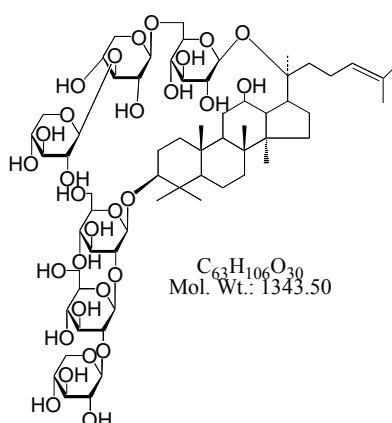
$C_{47}H_{80}O_{18}$
Mol. Wt.: 933.13

notoginsenoside R1



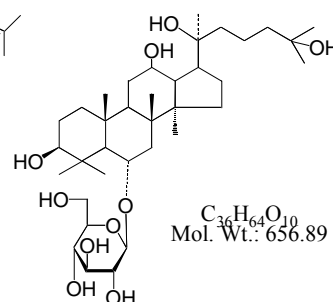
$C_{41}H_{70}O_{13}$
Mol. Wt.: 770.99

notoginsenoside R2



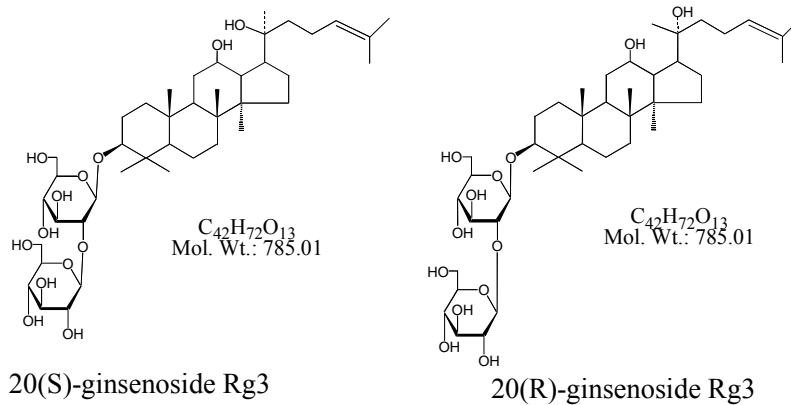
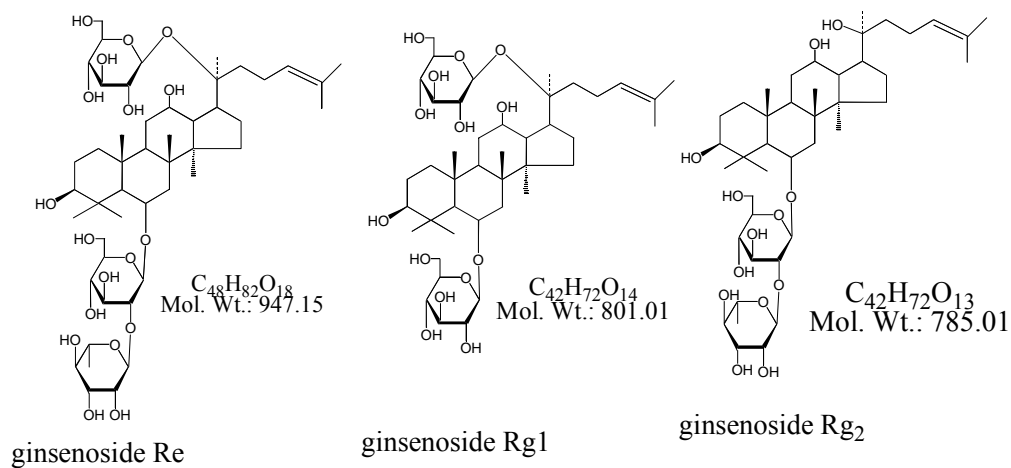
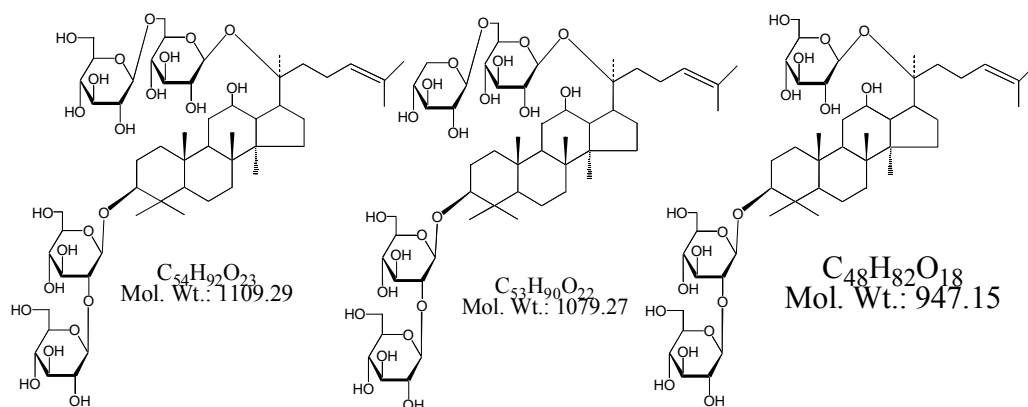
$C_{63}H_{106}O_{30}$
Mol. Wt.: 1343.50

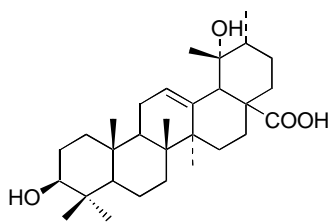
notoginsenoside-T



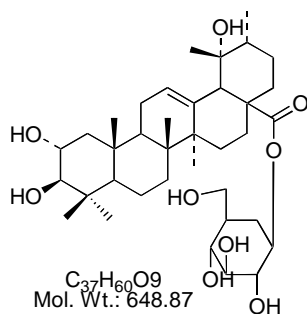
$C_{36}H_{64}O_{10}$
Mol. Wt.: 656.89

Notoginsenoside Rw-5

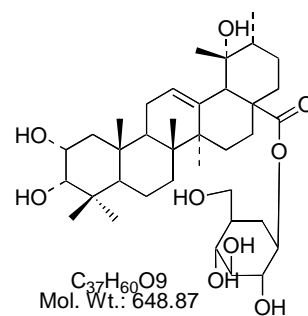




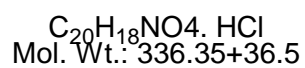
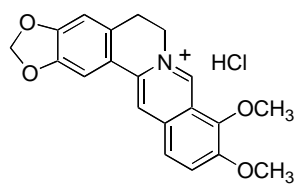
Euscaphic acid



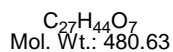
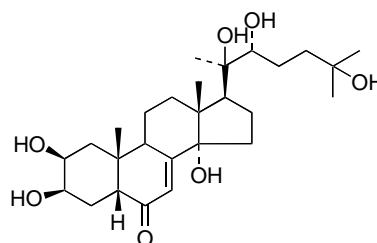
Rosamultin



Kaji-ichifoside F-1

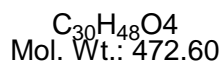
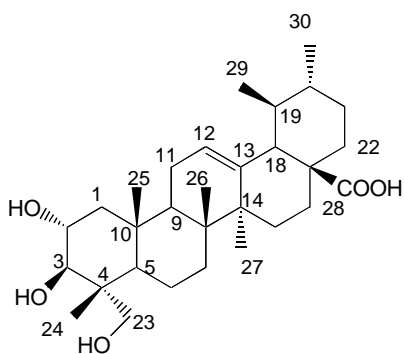


Beberine

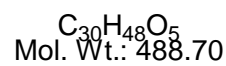
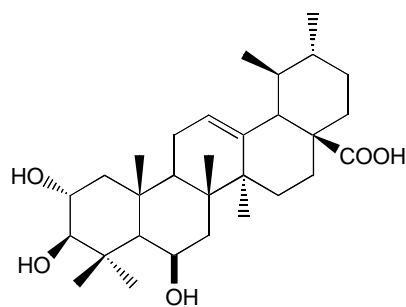


β -Ecdysone

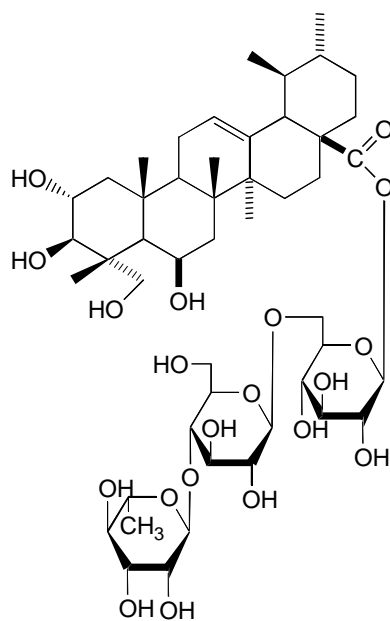
As-a (Asiatic acid)



As-a
asiatic acid



As-c
madecassosic acid



$C_{48}H_{78}O_{20}$
Mol. Wt.: 975.12

Jx-1 (madecassoside)

9. Dyrknings-, høst- og ekstraktionsmetoder for bær og frø

Martin Jensen

Bær af ginseng er blevet mere interessant som råvare efter, at man i de senere år har fundet en betydelig blodsukkersænkende effekt af amerikansk ginseng bær kombineret med egenskaber som sænker vægten af de forsøgsmus, der er testet. Sidstnævnte effekt findes tilsyneladende ikke i ginseng rødder, hvilket gør bærrene særligt interessante i forhold til udvikling af nye produkter til forebyggelse af diabetes uden fedmeskabende bivirkninger. Da bevidst bærdyrkning ikke er en kendt aktivitet og der samtidig findes meget lidt viden om bærproduktion har målet med delprojektet været, at foretage en række indledende undersøgelser til belysning af bærdyrkningspotentialer, variation i plantematerialet mv. i forbindelse med en fremtidig evt. bevidst bærproduktion i semi-permanente plantager, som alternativ til den enkelte høst pr afgrøde, der typisk gennemføres i år 3 eller 4 for amerikansk ginseng. Bærråvarer kan derfor udgøre enten den primære salgsvare eller indgå som supplerende salgsvare til rødderne på ligefod med salg af frøet til såsæd. Bærråvarer kan enten tænkes forarbejdet til rene ginsengprodukter eller benyttes som iblanding i andre produkter til værdiforøgelse.

Der er gennemført en række analyser af bærproduktion mht. udbytte pr areal og pr planteenhed, samt variation i stand og bærstørrelse mv. Undersøgelserne er baseret på forsøgsplantagen hos Danmarks JordbrugsForskning. Der er her inkluderet høstdata fra flere år for, at skabe et så godt billede som muligt af produktionsmulighederne. For at få et billede af genetiske forskelle mellem enkeltplanter og dermed betydningen af og muligheden for, at øge udbyttet af bær ved selektion i plantematerialet er der yderligere sammenlignet parametre for en række bærstande fra tvillingeskud.

Modningsforløbet af bær er desuden beskrevet og præsenteret i delprojekt 6. I forbindelse med en evt. fremtidig mekanisering af høst af bær er der foretaget observationer af bærstandenes placering i plantemassen, spredningen af bærmodenhed over tid samt dryssefasthed.



Metoder og resultater

På 1 årige rødder udplantet i foråret 2000 ved DJF er der i følgende år høstet følgende mængder frugt og frø. Data er opdelt i udbytte for de største 10 % rødder ved udplantning og de 10 % næststørste rødder, med henblik på at vurdere evt. fordele ved selektion af største rødder.

Æstimerne for bærmængde pr ha er beregnet under forudsætning af 60 % effektivt bedareal (40 % gange og veje).

2001 høst 5. september (3 års rødder)

ca. 0,3 kg frø/30 m² bed af oprindeligt 10 % største rødder, 0,01 kg/m² bed. (60 kg/ha)

Skønnet udbytteforhold af frø for største: næststørste rødder = 100 : 75

2002 høst 13/8 (4 års rødder)

30 m² bed 10 % næststørste rødder: 1,74541kg renset frø, svarer til 349 kg frø /ha)

2003 høst 25. august (5 års rødder)

30 m ² bed 10 % største:	bær 13,4 kg svarende til	2,68 tons/ha
	frø 2,55 kg	510 kg/ha
30 m ² bed 10 % næststørste:	bær 8,75 kg	1,75 tons/ha
	frø 1,8 kg	360 kg/ha

Udbytteforhold største: næststørste = 100 : 65

2004 høst 9. september (6 års rødder)

Største rødder:	Bær	svarende til	1,22 tons bær/ha
	Frø		297 kg frø/ha
Næststørste rødder:	Bær		0,75 tons bær/ha
	Frø		172 kg frø/ha.

Udbytte forhold største: næststørste = 100 : 61

2005 høst september (7 års rødder)

Høst på blandede bede primært fra 10 % næststørste rødder

3368,847 gram bær høstet fra 18 m² bed, giver 187,16 g bær/m²

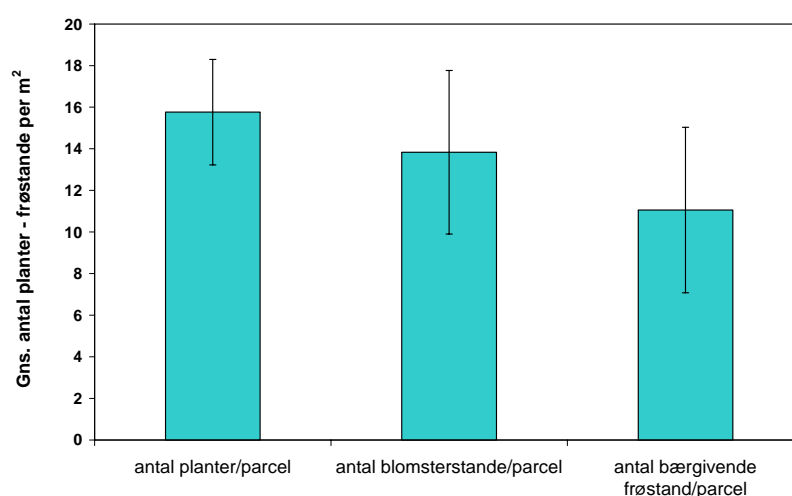
Svarende til 1,123 tons bær/ha



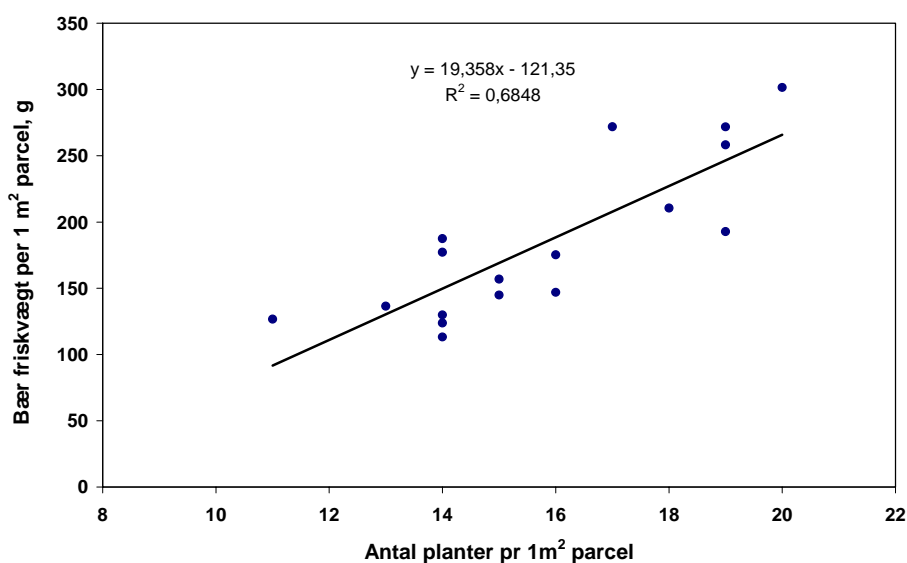
Modning af bær starter nedefra og op mod centrum i bærstand

Høst af frø angives i litteraturen ofte til, at ligge omkring 3-500 kg frø pr ha i år 4 for amerikansk ginseng. Den faldende tendens for frø og bærmængde i 6 og 7 års rødder kan skyldes et generelt faldende antal planter pr m² bed og vurderes ikke, at være udtryk for, at ældre planter generelt giver færre bær eller frø. Plantetallet pr m² vurderes i nærværende undersøgelser, at være til den lave side af hvad der er optimalt og udbyttet på op til 2,6 tons bær /ha i 5 års rødder vurderes, at være realistisk at opnå i flere år, såfremt plantetallet kan opretholdes. Det er almindeligt kendt, at man i normal dyrkning mister planter over årene og derfor typisk ikke udskyder høsten for længe. Sygdomme og frostskafer mv. vil spille en stor rolle for plantetallet og dermed også potentialet for bærproduktion.

I efteråret 2005 blev der registreret i detaljer i 18 udvalgte bedparceller a 1 m², primært udgjort af rødder fra næststørste selektion i 2000. Resultaterne er vist i de følgende diagrammer.

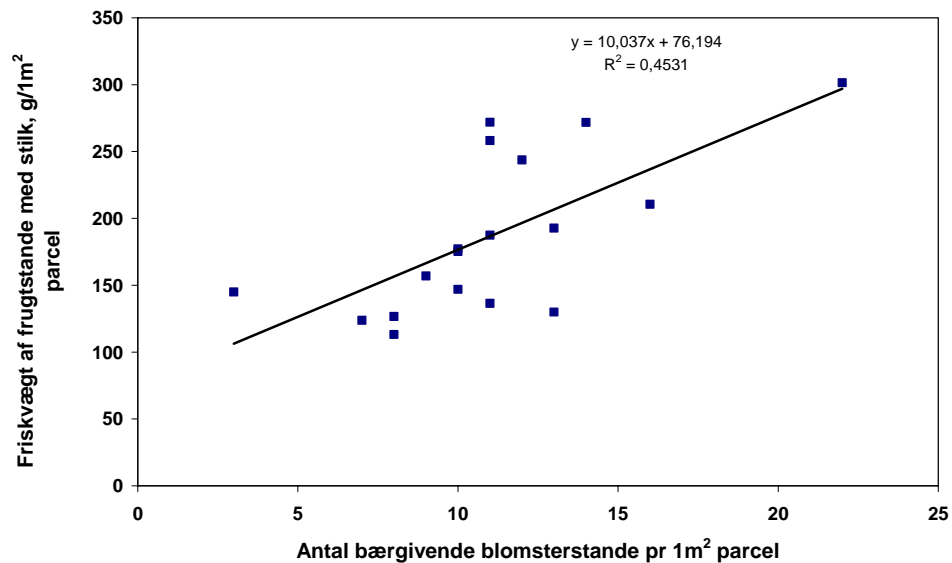


Figur 9.1 Antal planter, blomsterstande og bærgivende frøstande pr. m² bed i de 18 bedparceller a 1 m² der er målt. Enkelte frøstande er misformede og uudviklede og giver ikke bær eller frø.

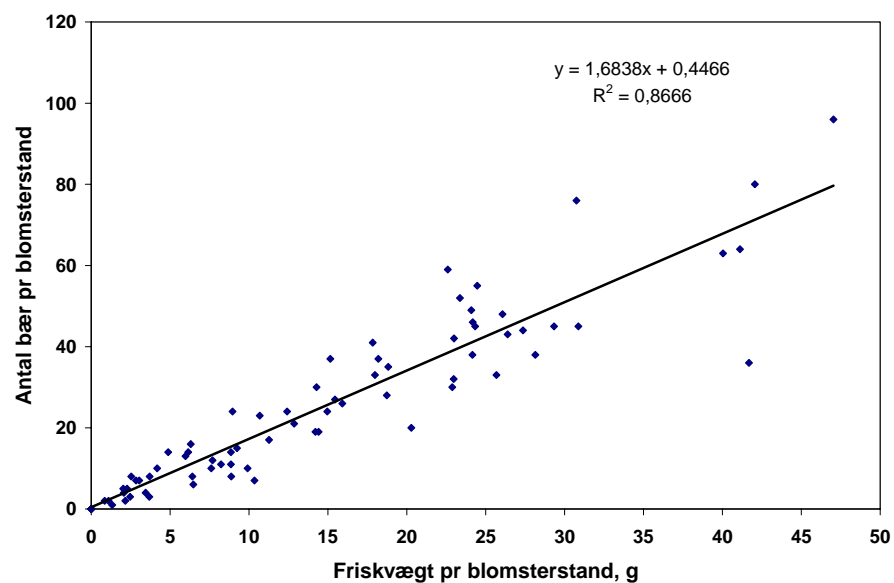


Figur 9.2 Mængden af bær høstet pr m² parcel i forhold til antallet af planter pr parcel.

Resultatet i figur 9.2 og 9.3 antyder, at det øgede antal planter pr 1 m² bed parcel endnu ikke er nået til et niveau, hvor konkurrencen er så stor, at den producerede bærmængde pr areal flader ud eller reduceres. Der er således indikation af, at plantetal på over 20 planter pr m² bed for 7 årige rødder vil kunne give endnu større bærproduktion pr areal.

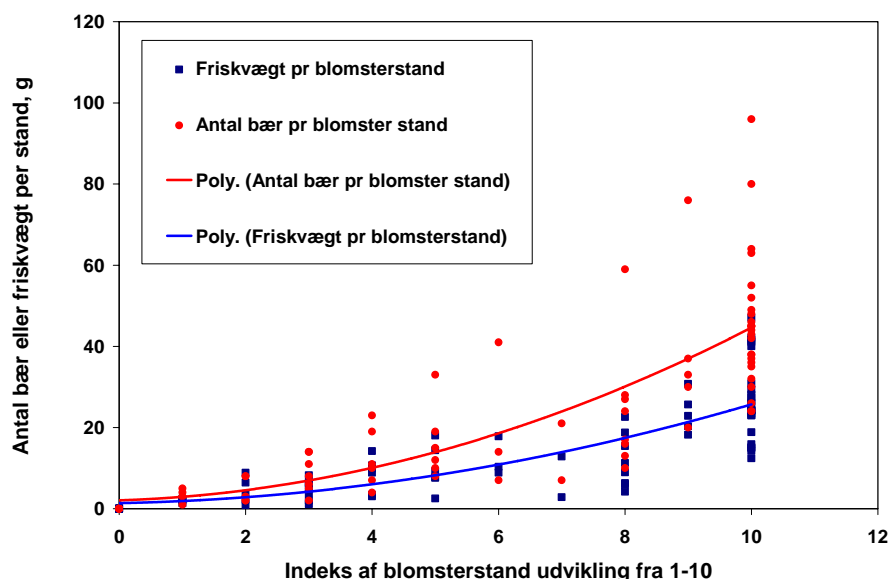


Figur 9.3 Total friskvægt af frugt med stilk pr m² i forhold til antal bærgivende blomsterstande.



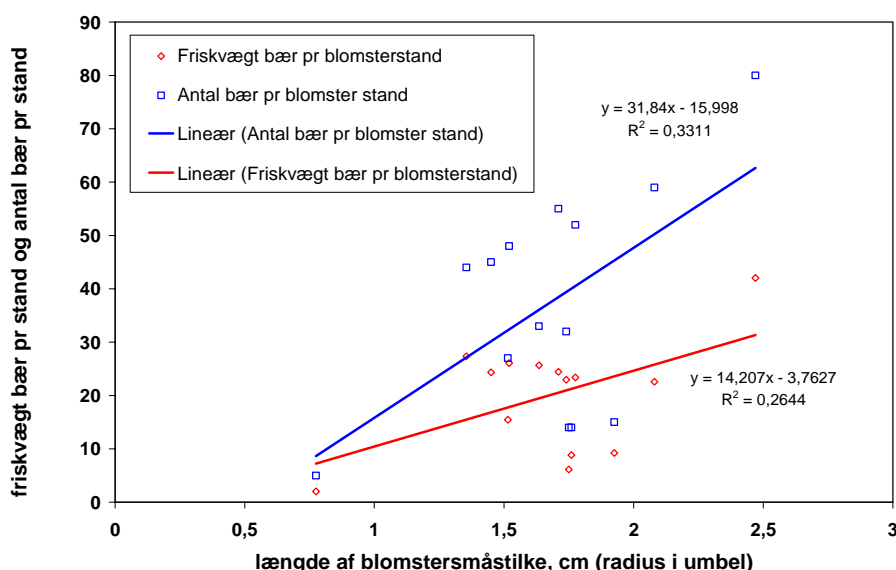
Figur 9.4 Sammenhæng mellem antallet af bær pr blomster stand og friskvægten af blomsterstanden.

Det ses at antallet af bær korrelerer stærkt med friskvægten, hvorfor det er afgørende for højt udbytte, at få så mange blomster bestøvet og bær sat i blomsterstanden som muligt. Det er samtidig indlysende, at man for at øge udbyttet fremover vil have fordel af at selekttere planter, der giver store og fuldt udviklede bærstande med mange blomster og bær. Dette vil også reducere manuelle høstomkostninger.



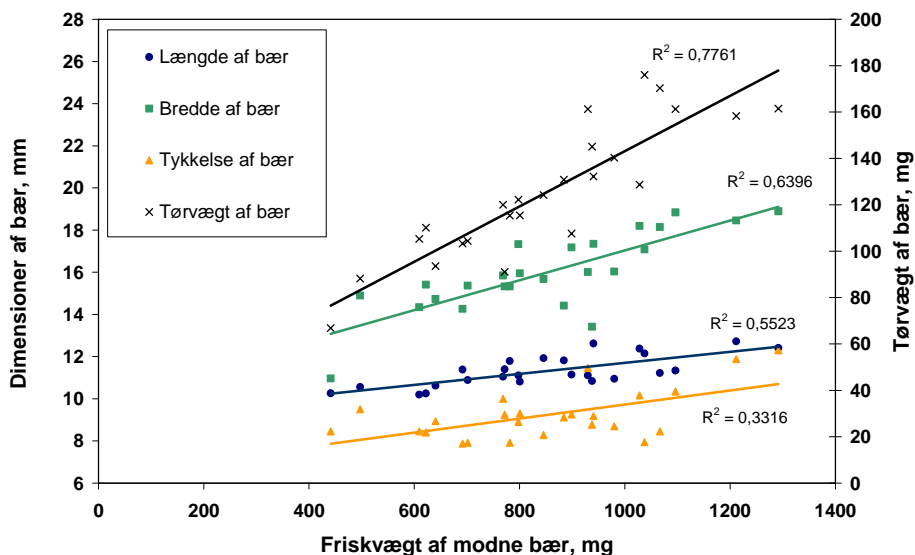
Figur 9.5 Antal bær og friskvægt i forhold til udviklingen af blomsterstanden på 80 enkeltstande, her udtrykt på indeksskala fra 1 til 10, hvor 1 er manglende børsætning og 10 er maksimal børsætning, dvs. alle enkeltblomster i bærstanden har bær.

Resultaterne i figur 9.5 understreger yderligere behovet for, at sikre sig fuldt bestøvede og fuldt udviklede frøstande for, at optimere bærudbyttet. Manglende bestøvning, svampe- og insektangreb vurderes at være de alvorligste påvirkninger, der reducerer udbyttet i denne forbindelse. Enkelte planter producerer tilsyneladende små blomsterstande, der udvikles dårligt i enkeltår, men det er ikke kendt om samme plante bærer dårlige blomsterstande år efter år, eller det mere er et udtryk for dårlige forhold det enkelte år (vekselvirkning). Tvillingeskudsanalyserne (se senere) tyder dog på en særdeles kraftig genetisk indflydelse på blomsterstandsudvikling.



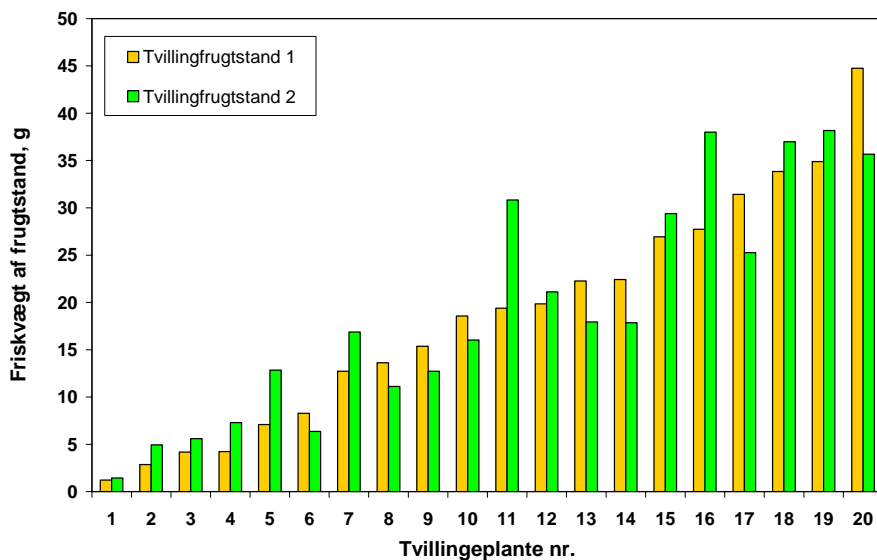
Figur 9.6 Bærfriskvægt og antal bær pr stand afhængig af længden af småstilke i blomsterstanden.

Der er kun meget svag korrelation mellem længden af småstilke og antal og vægt af bær pr blomsterstand, og småstilk længden har derfor ikke direkte nogen betydning for udbyttet. Indirekte vil korte småstilke give meget tætsiddende bær, som ved modenhed har større risiko for, at blive angrebet af gråskimmel og andre svampesygdomme pga. af den højere fugtighed. Bærrene sidder her ved modenhed ofte mast tæt sammen skulder ved skulder.

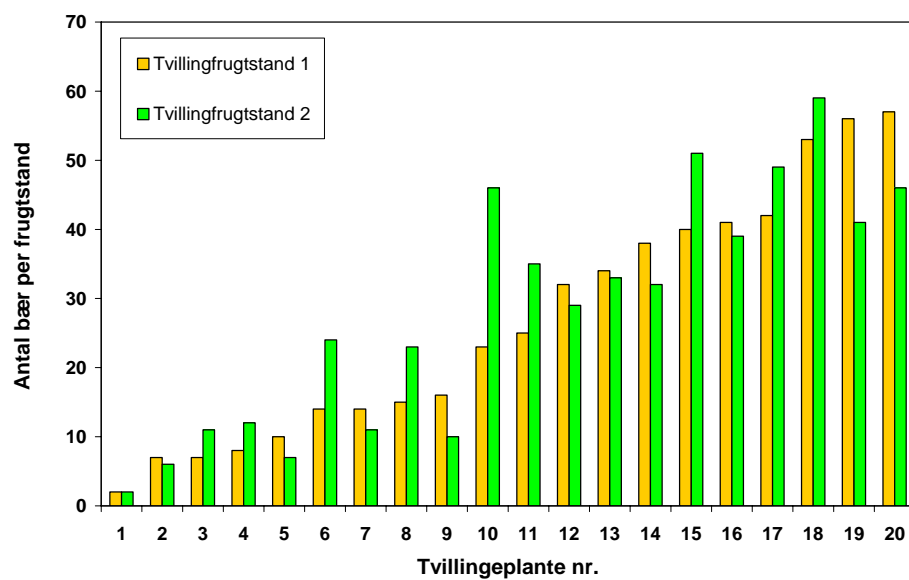


Figur 9.7 Sammenhæng mellem friskvægt af modne bær og dimensioner af bærret. Som reference er tørvægtsdata også indsat.

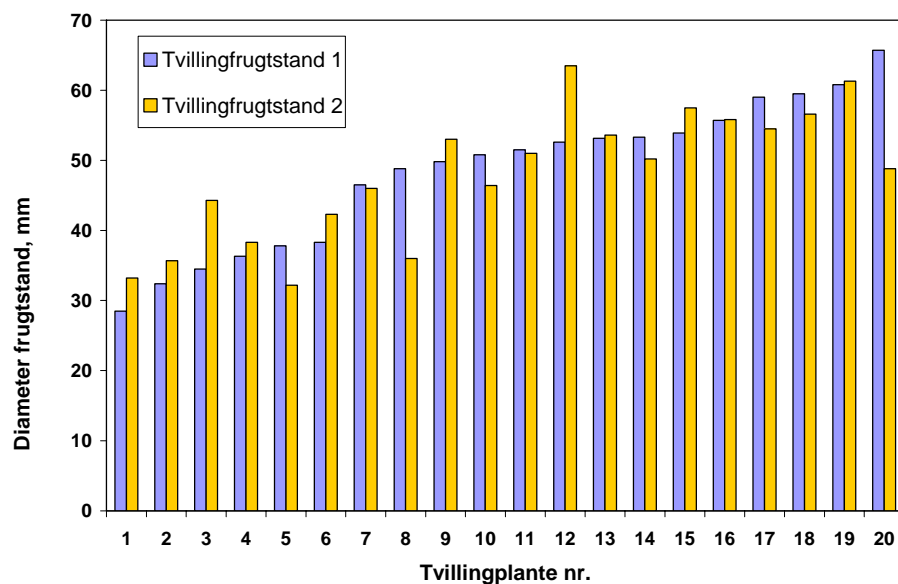
Det ses af figur 9.7 at bredden af bærret korrelerer bedst med friskvægten af bærrene, og at det dermed er denne dimensionsparameter der bidrager mest til øget bærvægt.



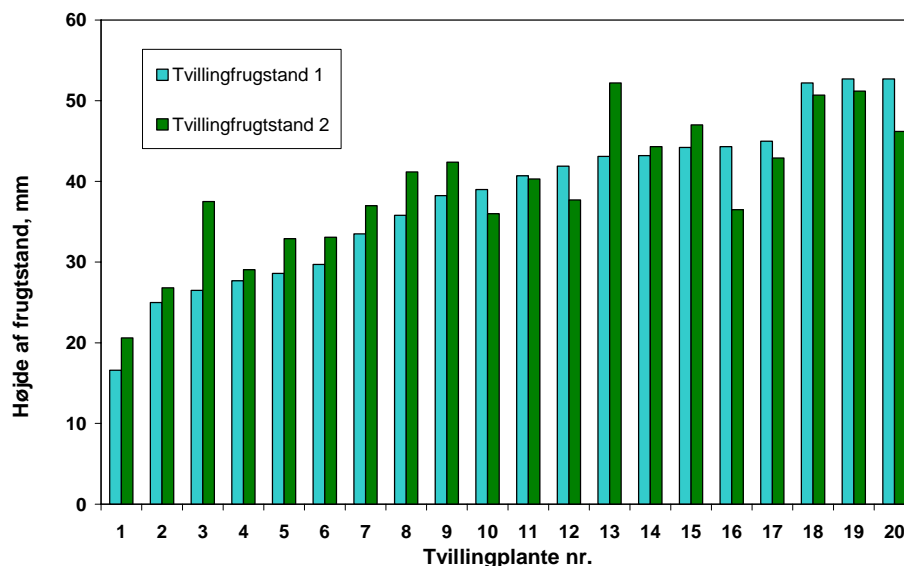
Figur 9.8. Sammenligning af bærfriskvægt pr blomsterstand i 20 tvillingeskud (ginseng planter med 2 blomsterstande). Data er for overskueligheds skyld sorteret efter stigende friskvægt i tvillingeskud 1 mod højre. Bemærk at forskellene mellem de to tvillingestande fra samme plantennr. er små i forhold til den variation, der er mellem blomsterstande fra de 20 enkeltplanter.



Figur 9.8. Sammenligning af antal bær pr stand i tvillingebloomsterstande (se forklaring i figur 9.7).



Figur 9.9. Sammenligning af tvær-diameter af bærstande i tvillingebloomstrende planter (se suppl. forklaring i figur 9.7).

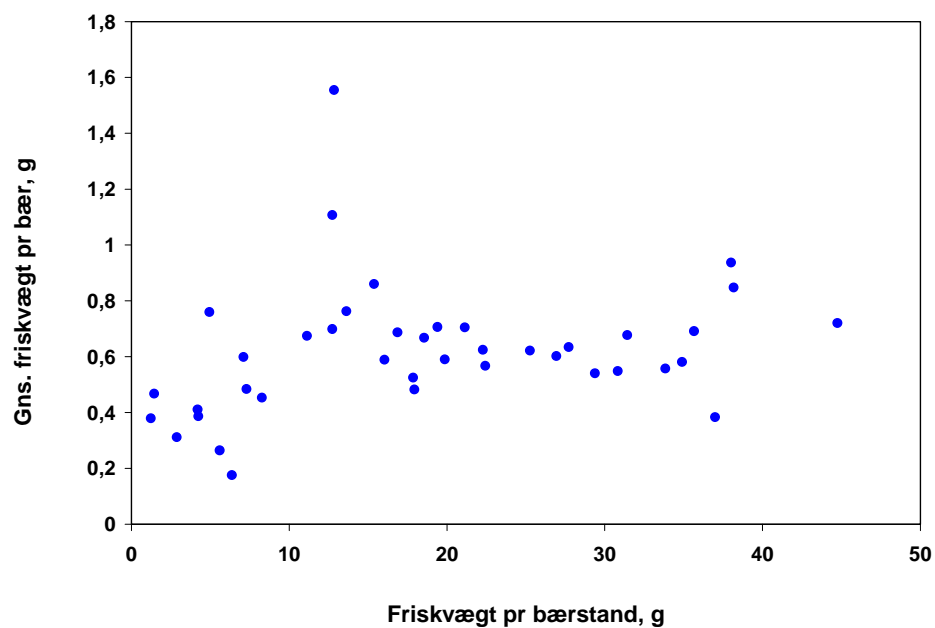


Figur 9.10. Sammenligning af højden af bærstande fra tvillingeplanter. (se suppl. forklaring i figur 9.7).

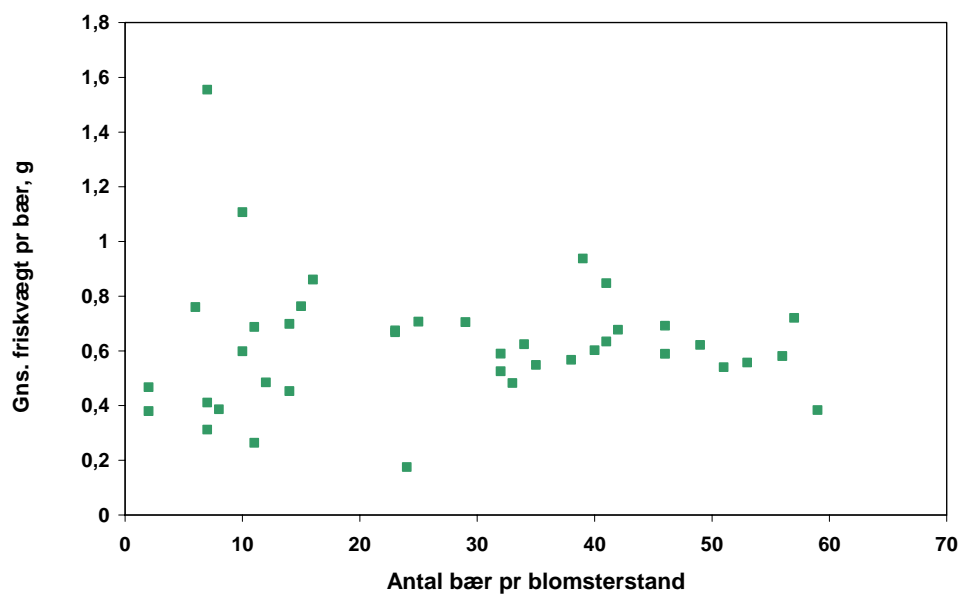
Figur 9.7 – 9.10 viser med stor tydelighed at genetikken i den enkelte plante er stærk bestemmende for blomsterstandens størrelse og udvikling, og at tilfældige miljøpåvirkninger dermed betyder meget lidt for udbyttet i denne undersøgelse. Det er derfor meget tydeligt, at der vil være en stor fordel af at selekttere planter med store blomsterstande med mange blomster, der vil kunne give den største bærmængde pr plante og bærstand. Derudover viser målingerne, at samme genetisk stærke styring gør sig gældende mht. plantens struktur og dimensioner. Observationer af dimensionerne af hovedblomsterstilke under blomsterstanden viser tilsvarende, at det vil være muligt at selekttere planter med ønskede stilk længder og placering over bladhænge, hvorved en mekanisk høstmetode vil blive mere sandsynlig. Enkelte observationer tyder ligeledes på at nogle blomsterstande modner mere ens over tid end andre og at meget variabelt modnende planter dermed vil kunne frasorteres i en selektion. Dette vil give mulighed for, at arbejde frem mod fuld høst på et tidspunkt frem for oftest to høsttidspunkter. Udvalgte fotos af tvillingebærstande er vist i figur 9.11.



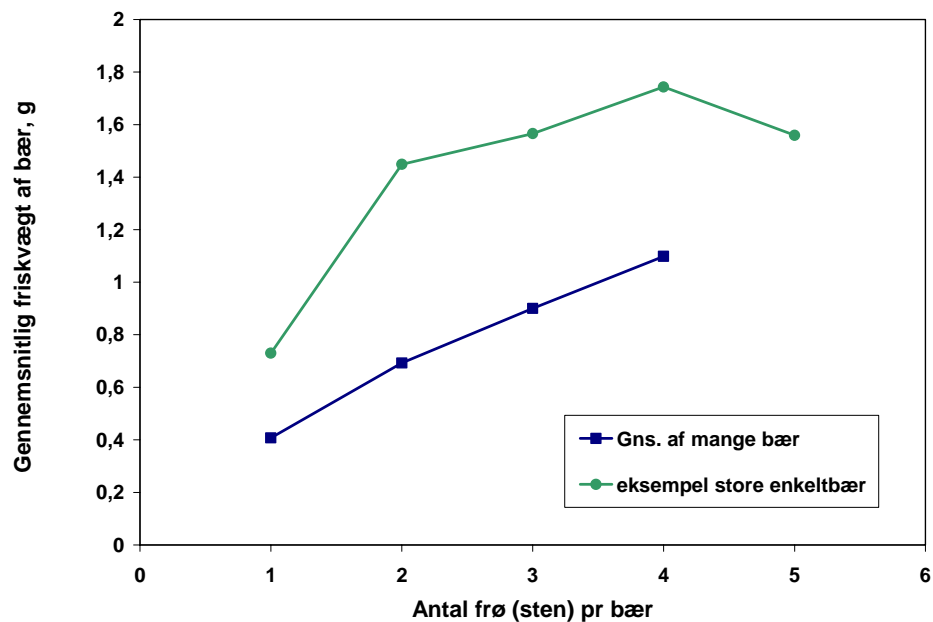
Ensartethed i bærstandudvikling hos tvillingeskud af ginseng indikerer stærk genetisk effekt.



Figur 9.12. Sammenhængen mellem gennemsnitlig friskvægt pr bær og totalfriskvægten af bærstanden. Større bærstande med flere bær giver ikke generelt anledning til mindre bærstørrelser. Omvendt ses at enkelte planter giver meget store bær, mere end dobbelt så store som gennemsnittet.



Figur 9.13. Sammenhængen mellem gennemsnitlig friskvægt pr bær og antal bær i bærstanden. Større bærstande med flere bær giver ikke anledning til mindre bærstørrelser. Omvendt ses at enkelte planter giver meget store bær, mere end dobbelt så store som gennemsnittet.



Figur 9.14. Betydningen af antal frø pr bær for bærfriskvægten. Antallet af bær med 2 frø er stort, noget mindre for 3 frøede bær og meget mindre for 1 og 4 frøede bær. Der er kun fundet 2 stk. 5 frøede bær ud af flere tusinde bær. Der kan maksimalt dannes 5 frø i en blomst.



Ginsengbær med fra 1 til 5 frø pr bær.

Observationer har vist at nogle planter sætter flere bær med 3 frø end andre planter, og da bær friskvægten stiger med 3 frø kan det overvejes at selektere for 3 frøede bær. Da andelen af frøets masse også stiger er det dog ikke kendt om det reelt giver en øget andel bærmasse, der er interessant at gå efter. Er frøet ikke af interesse er det vigtigere at øge bærmassen omkring frøet end antal frø.

Sammenlagt kan det konkluderes, at der er betydeligt potentiale i, at selektere mere ens og bedre plantemateriale i forbindelse med en fremtidig etablering af en bærproduktion af amerikansk ginseng både af hensyn til udbytte og håndteringsmuligheder. Det har også vist sig, at det er muligt at holde en pæn produktion af bær og frø selv i 7 årige rødder af amerikansk ginseng og at såfremt plantetallet kan holdes ikke synes noget i vejen for, at opretholde en semi-permanent bærproduktion i op til over 10 år på samme areal og plantebestand. Kritiske faktorer er sygdomme, skadedyr og klimaskader. Den optimale plantetæthed for bærproduktion afhænger sandsynligvis meget af planternes trivsel og tilvækst og vil derfor ikke være entydig. I nærværende 7 årige plantning ligger det optimale

plantetal på over 20 planter pr m². Højeste produktion af bær ved DJF er set i 5 årige planter med et plantetal på ca. 35-40 planter pr m². bed svarende til et udbytte på 2,6 tons bær/ha ved 60 % arealeffektivitet. Heraf udgør frøet ca. 20-25 % vægtmæssig og et rensset bærudbytte på ca. 2 tons /ha vil være et mål. Tiltag der fremmer bestøvning og især fremmedbestøvning samt almindelig pasning med vand og næring, der beforder en almindelig god bærudvikling, men uden at øge risikoen for svampeangreb, vil kunne sikre et godt resultat i en bærproduktion. Disse forhold er ikke berørt videre i denne rapport.

Høst og forarbejdning

I langt den overvejende del af ginseng produktionen i verden høstes bærrene alene med det formål, at sikre frø til næste produktionscyklus. Selve bærret og evt. saftkomponenter af dette anvendes dermed ikke, men bliver kasseret i processen med oprensning af frøet. I meget begrænset målestok findes specialproduktioner af tørrede bær, saft eller juice produkter, som oftest sælges direkte fra producenten/ginsengavleren eller i specialbutikker.

Her gennemgås først standard metoder vedr. høst og frørensning og dernæst mulige procesmetoder, der vil kunne tillade udnyttelsen af bær og saftdelen af ginseng bær i fremtiden udover at sikre frøet som ressource.

Amerikansk og koreansk ginseng ligner vækstmæssigt hinanden så meget, at de praktiske høstmetoder og bærprocessering vurderes, at kunne være de samme. Denne gennemgang er primært baseret på viden om amerikansk ginseng fra litteratur og fra egne erfaringer.

Høst af ginseng bær.

Ginseng blomster og frugtificerer først af betydning i år 3, mens nær maksimal bærudbytte først opnås i det 4. år. Ældre planter vil oftest fortsætte med, at give bær i god mængde, men udbyttet pr areal vil ofte blive presset nedad af et faldende antal planter/areal med øget alder i dyrkede bede. Dette er primært forårsaget af øget sygdomstryk med øget alder. Omvendt ses ofte et højere antal planter med flere skud og dermed flere blomsterstande i ældre planter. Der er ingen dokumentation af eller erfaringsviden publiceret vedr. længerevarende bær/frøavl i ginsengplantager, men det er kendt at nogle plantninger kan give betydeligt flere bær og frø end andre, hvilket har givet anledning til en lokal og tidsmæssigt afgrænset specialisering i bærproduktion til frø.

Placering af blomsterstand og bær i afgrøden

Der kan være op til ca. 50 blomster i en skærm, men ikke sjældent er der et noget mindre antal. Skærmdækningsgrad og antal bær pr stand er genetisk bestemt og der kan være stor variation mellem enkeltplanter i den samme population. Selvom alle blomster og bær i princippet kan danne 5 frø, dannes der dog primært bær med 2-3 frø pr bær og i mindre omfang bær med 1 eller sjældent 4 og 5 bær.

Blomster og bær sidder i halv- eller helskærme på korte 1-3 cm lange småstilke, som stråler ud fra toppen af den basale blomsterstilk. Denne basis blomster stilk varierer meget i længde fra plante til plante (fra få cm længde til måske 15-18 cm længde). Dette gør, at blomster og bær hos nogle planter sidder næsten skjult mellem ginsengplantens blade, mens de hos andre planter sidder frit og oprette over bladene. Mekanisering af høst ville være relativt nemmere hvis alle planter havde lange blomsterstilke, der sad frit over løvet og alle planter havde nogenlunde sammen stilkhøjde. Da der ikke er foretaget en selektion

for et mere ensartet udseende af ginsengplanter, er det for nuværende ganske vanskeligt at mekanisere høsten af ginseng bær, uden samtidig at beskadige løv og stilke betydeligt. Hertil kommer problemer ved separering af en evt. blandet bær og løvmasse efterfølgende, samt den negative effekt på rodmasse og kvalitet, herunder evt. problemer med overvintring og sygdomsmodtagelighed.

Bærmodning

Blomstring sker først i de yderste/nederste dele af blomsterstanden, og bærmodningsforløbet svarer til dette. Undersøgelser fra Nordamerika har vist, at ginseng bær i en skærm typisk modner over en ca. 3 ugers periode, fra første til sidste bær er modent. Bærret skifter fra grøn farve og fast struktur over lillagrøn til dybrød farve og blød bærtekstur. Ved fuldmodenhed øges saftandelen i bærret betydeligt og frugtskindet begynder, at revne og henfalde. I denne fase er bærrerne meget modtagelige for angreb af gråskimmel og potentielt andre svampe, der går på frugter. Hos de fleste planter falder bærrerne af småstilkene ved modenhed, mens de hos nogle planter kan blive siddende i længere tid eller falder af samlet ved, at basisblomsterstilken knækker af ved mekanisk påvirkning, eks. vind. Den store variation i hvor fast bærrerne sidder og hvordan de spredes gør det yderligere vanskeligt, at mekanisere høsten. Rystning af bærstande sikrer ikke, at alle bær høstes. Evt. sprøjtning med ethylen mhp. dannelse af løsningslag i bærstilke nogle dage før høst kunne være en undersøgelse værd. Canadiske undersøgelser har vist, at ethylen sprøjtning kan bevirke blomsterfald i juni måned således, at blomstring og bærsætning kan undgås i år 3 og 4, hvorved et øget udbytte på 30-50 % af rødder kan opnås.

Manuel høst af bær

Den almindeligste metode til, at høste ginsengbær er stadig håndplukning, selvom der er foretaget forsøg med mekanisk høst i BC Canada. Der plukkes typisk af to gange med 1,5-2 ugers interval hvorved næsten alle bær kan høstes i fuldmoden tilstand, hvilket sikrer bedste frøkvalitet og spiring. Det er dog oftest mere økonomisk, at høste en gang og lade bærrerne modne godt, og herunder acceptere et lille tab af bær der falder af for tidligt. En nordamerikansk arbejder kan typisk plukke over 50 kg bær pr dag. Typiske tal for skønnede arbejdstimer til høst af ginseng bær andrager godt 100 timer pr ha i år 3 og godt 200 timer pr ha i år 4. Der regnes med høst af godt 400 kg frø pr ha i år 4. (BC produktionsguide)

Forholdet mellem frugtvægt og frøvægt er ca. 4,5 til 1, dvs. 400 kg frø svarer til ca. 1800 kg frugt.

Det kan overvejes om en maskinel høst (afklipning og opsamling) af de bærskærme, der sidder over bladmassen, kan gennemføres for at reducere antal timers efterfølgende høstbehov af bærskærme 'nede i afgrøden'. En manuel bærhøster kan dog samtidig sortere eller fravælge dårlige frugter, mens en maskine tager alt med. Kvaliteten kan derfor godt blive påvirket ved maskinel høst. Der er ikke fundet beskrivelser af maskinhøst teknikker.

Bærkvalitet – mikrobiologisk kontaminering og stabilitet

Da bær i plantager naturligt kan være inficeret med en række plantepatogene organismer (svampe og bakterier), der dels kan give forringet bærekstrakt kvalitet og dels give toksikologiske og holdbarhedsmæssige problemer i et produkt, er det afgørende at den bærmængde, der plukkes og anvendes, repræsenterer sunde og veludviklede bær uden

synlige angrebs symptomer. Bær kan skylles i vand for, at fjerne de værste urenheder mv. og det er i såfald afgørende, at vandet der anvendes er sundhedsmæssigt rent. En pasteurisering af bærrene kan komme på tale for at sikre et mikrobiologisk stabilt produkt efterfølgende i processen. Dampning, eller blanchering af bær i kogende vand i kort tid kan overvejes for, at fjerne ydre patogener. Det bør dog tjekkes, at disse metoder ikke nedbryder de evt. aktive stoffer som bærrene indeholder. Såfremt bærproduktet tørres eller fryses hurtigt eller der foretages en kemisk ekstraktion, der dræber evt. patogener, er denne råvarepasteurisering måske ikke nødvendig.

Fjernelse af frugt for at opnå rent frø

Fjernelse af frugtkødet gøres oftest ved, at lade bær gå mere eller mindre i opløsning i få dage til en uge før frøet vaskes ud på sold ved at spule vand på massen. Denne eftermodning af bær skal ske forsigtigt for ikke at skade frøet, dvs. bærrene lægges f.eks. i tyndt lag (ca. 5-8 cm) på cement gulv, i netsække eller i kasser med plast eller metalnet i bunden, så der sikres dræn og iltadgang og gæring af massen undgås. Der skovles/blandes rundt 1-2 gange om dagen for, at sikre jævn blanding og tilstrækkelig ilttilførsel. Massen holdes fugtig og saften skal drænes væk så frøet ikke skades. Bærrene må ikke lugte gærede, så vil frøet have risiko for at være skadet.

Jo mere opløste/nedbrudte bærrene er, jo nemmere er det at rense frøet helt rent for frugtkødsrester. Netop frugtrester på frøet er vækstpunkt for svampe under den efterfølgende frøbehandling og bør så vidt muligt undgås.

Når bærrene er godt nedbrudte kan bærmassen enten lægges på et plant soldnet, hvor frugtkødsrester kan spules igennem med vand, men hvor frøet bliver liggende på nettet. Frugtmassen kan også placeres i en roterende metal nettromle, en såkaldt frøvasker, hvor massen roteres med løbende tilførsel af vand. Frugten slås hurtigere i stykker ved rotationen (vinger der maser bærrene mod siderne) og skylles ud af nettromlen med vandet. Da frøet af ginseng har et hårdt ydre der tåler en del mekanisk belastning uden at skades, er det muligt at foretage en ret hård mekanisk bearbejdning af bærmassen forud for skylning med vand. I laboratorium format har det ved DJF AHP været almindeligt, at blende bær med lidt ekstra vand ved lav hastighed i f.eks. 20-30 sekunder, hvorefter alt frugtkød er slået af frøet. Denne teknik vil gøre det nemmere at rense frugtkød af frø selv uden en eftermodning/nedbrydningsperiode, dvs. på frisk høstet bær. Hastigheden skal afpasses således, at frøet ikke slås i stykker men, at frugtrester effektivt fjernes fra frøet. Denne teknik minder om den 'maceration' (eng.) der foregår i en slagmølle til fjernelse af bl.a. kirsebær frugt fra kirsebær sten i frørensning hos frøfirmaer.

Blendningsteknikken er af stor interesse, da den potentielt vil tillade at adskille frugt og frø af nyhøstede bær af høj kvalitet i to anvendelige fraktioner; dels frø til videre planteproduktion, dels frugtekstrakt til videre anvendelse i farmaceutiske/plantemedicinske/novelfood produkter. Sidstnævnte råvare er blevet meget mere interessant efter offentliggørelsen af forskning, der tyder på at ginseng frugten udover en blodsukkerstabiliserende effekt også har separat vægttabs egenskaber hos diabetiske mus.

En mulig anvendelse af ginseng bær vil øge indtægterne i den eksisterende ginseng produktion og dermed forbedre rentabiliteten.

De ovenstående frugter/frøseparationsteknikker gennemføres typisk som batch processer, selvom slagmølle princippet kan køre som kontinuert fødet proces. Der regnes med ca. 10 timer/ha til, at rense høstet frø i år 3 og 20 timer i år 4. (BC-MAFF, Canada)

Overvejelser af fremtidige metoder til separering af bær og frø

Ved DJF-AHP er der i projektets regi fremstillet ekstrakter af bær på forskellige måder mhp., at teste disse ekstrakter dels for indhold af ginsenosider og polyacetylenier og dels for aktivitet i diabetes bioassay. I disse tests er det afgørende at frøkomponenten er skilt fra bærrerne før ekstraktion for aktivstoffer påbegyndes, da det ellers er uklart om stofferne findes i frø eller frugtkomponenten.

Derudover har det været af interesse at undersøge hvor evt. aktivstoffer primært findes i bærret, i bærskindet, i bærsaften eller i frugtkødet (pulpen). Der er derfor fremstillet 4 typer ekstrakter ved følgende processer:

1. Hele bær-ekstrakt. Hele modne bær placeres i blender med kendt mængde ekstra vand tilført (volumen vand så bærrerne lige er dækket i blender) og derefter blendet ved laveste hastighed (laveste af 7 hastigheder) i 20-30 sekunder. Herved frigøres frø og frugt fra hinanden, i en let tyktflydende vandig masse. Denne sigtes igennem plast sigte med hulstørrelse ca. 2 x 2 mm. Frøet tilbageholdes mens bærmassen overvejende falder igennem sigten selv. En mindre mængde skum og lidt frugtkødsrester bliver hængende på sigten og frøet og skal enten skyldes igennem med lidt ekstra vand (evt. spray for minimalt vandtilførsel) eller slynges igennem sigten (f.eks. ved centrifugering) for at få 100 % udbytte. Tabet ved ikke at få den sidste rest med vurderes at være under 1 % vægtbaseret af den totalt udvundne frugtmasse. Processen efterlader en let fortyndet og findelt, vandig, rødlig bærekstrakt og en rensset frømængde, der er uskadt. Denne proces bør kunne gennemføres teknisk i storskala som kontinuert fødet proces. Finoprensning af dette produkt kunne gøres effektivt ved membranseparationsteknikker/centrifugeringsteknikker mv.. Et apparatur i 'farmsize' (1-50 ha) kunne have afsætningspotentiale i såvel Nordamerika og i Kina, Korea og Japan.

2. Bær- presse saft. Hele modne bær placeres i trykpresse, og der trykkes en ren pressesaft ud af bærrerne uden en forudgående ødelæggelse af bærrerne. Princippet svarer til en æblepresse.

Processen efterlader en ren klar pressesaft uden farve (kun frugtskind indeholder rød farve), samt en pressekage med frø, der efterfølgende ekstraheres med vand som i metode 1. Det forudsættes, at ren pressesaft har en højere værdi end en vandig ekstrakt som i metode 1.

Processen er i laboratoriet kørt som batch proces, men vil kunne udvikles til kontinuert presse proces uden problemer. Processen kan evt. kombineres med membranseparation/centrifugering for, at maksimere udbyttet.

3. Bærskinds fraktion.

Denne fraktion er speciel og kræver lidt ekstra håndtering. Bærskindet er ret tyndt og går let i stykker og er i frisk tilstand vanskelig, at separere fra restpulpen og frøet. I laboratoriet er frugtskindet fjernet manuelt med pincetter mv. hvilket er ekstremt tidskrævende.

Såfremt bærrerne fryses (-20C uden at fryse sammen til en klump) og udsættes for en ekstern hurtig og kortvarigt tøprocess (evt. dyppe i varmt vand i få sekunder) vil man kunne få et bær hvis indre er bundfrosset og hårdt mens den yderste mm af bærret, her bærskindet, vil være optøet og sandsynligvis let et gnide af bærret ved roterende mekaniske bevægelser i kort tid. Kombineres med en 'flushing' med kraftig vandstrøm eller en kraftig luftstrøm under denne proces, bør man kunne blæse det løsnede bærskind af og ned igennem et sold mens det frosne bær vil blive liggende. Processen kræver fin-tuning og hurtige delprocesser for at lykkes, men bør kunne give et produkt med relativ høj bærskindsindhold i forhold til metode 1. Frysning af opfugtede frø til under -5C vil normalt dræbe frøet, hvorved en værdifuld ressource mistes.

4. Rest frugtpulp fraktion

De hele modne bær fra fraktion 3, der har fået fjernet bærskindet, kan efterfølgende presses i bærpresse for, at fjerne pressesaft og dermed kun efterlade den rene frugtpulp som kan separeres fra frøet med tilførsel af vand som i metode 1. Alternativt kan hele pulpen med saft separeres efter metode 1.

For at fraktionering 3 og 4 er interessant kræves, at bærskind eller pulpfraktionen indeholder særlige stoffer som er interessante, at adskille fra resten, og at det er økonomisk mere interessant end en opkoncentrering ud fra et total bærekstrakt.

Ovenstående separeringer og ekstrakter af friske bær kan efterfølgende udsættes for yderligere oprensning, homogenisering, pasturisering, ekstraktion, tørring mv.

5. Tørre bærfraktioner

Udover ovenstående fraktioner kan man evt. forestille sig et produkt baseret på tørring af hele bær eller af pressekagen fra metode 2 alene.

En tørring i plantørrier eller tromletørrier ved op til 40C med god ventilation vil give en skrøbelig bær struktur, der sandsynligvis delvis vil blive slidt af frøet ved mekanisk påvirkning i tromle el lign. Løsnes frugtrester ikke helt kan det overvejes, at fryse frugtrester i flydende kvælstof i kort tid fulgt af en mekanisk påvirkning igen i frosset tilstand. Frøet vil normalt overleve denne behandling når det er helt tørt, mens bærfraktionen vil blive endnu mere skrøbelig og derfor nemmere adskilles fra frøet. Hvis frøet sigtes fra vil den tørrede bærfraktion udgøre et findelt råpulver, der kan bearbejdes yderligere.

Konklusion

Metoder til høst og forarbejdning af bær med henblik på at anvende bærret er endnu ret primitive og dårligt udviklede og oftest præget af manuelle processer.

Manuel høst er dyrt og det er derfor afgørende af få udviklet mekanisk høst af bær for, at holde omkostninger til arbejdskraft nede i en vestlig dyrkning. Der er dog en lang række problemer, der ikke lige kan løses, men kræver yderligere undersøgelser og udvikling.

Da både bærsaft og pulp må formodes, at blive en efterspurgt vare i fremtiden vil behovet for effektive metoder til, at håndtere og processere bærrene øges i fremtiden. Da frøet er en værdifuld ressource til såsæd vil metoderne sandsynligvis skulle tilpasses en ekstraktion af godt og spiredygtigt frø samtidig med udvindingen af bærpulp og saft.

Da bær produktion ikke i nærmeste fremtid vil blive af et væsentligt omfang i Danmark, vil værdien af nye viden og udvikling af teknologi til håndtering af disse processer i første omgang kunne finde anvendelse i Nordamerika og i Kina, Korea og andre asiatiske lande der dyrker ginseng. En dansk videre indsats på området skal derfor rettes mod et samarbejde, joint venture eller direkte salg fra danske firmaer/forskningsinstitutioner til disse lande.

10. Identifikation og selektion af største rødder med højeste koncentration af indholdsstoffer

Martin Jensen og Lars Porskjær Christensen

Skal danske avlere kunne konkurrere med de traditionelle ginseng dyrkende lande på verdensmarkedet, er det nødvendigt at skabe fordele i Danmark som kan opveje den billigere arbejdskraft i disse lande og i særdeleshed i Asien. Fordele kan f.eks. bestå af dyrkningsteknologiske mere avancerede og mere effektive metoder, hurtigere implementering af ny viden, bedre og mere servicepræget håndtering af afsætningsmarkedet og endelig også dyrkning af mere højtydende plantemateriale med højere og mere defineret kvalitet. Dansk jordbrug har en stolt tradition for at udvikle og anvende det mest forædlede plantemateriale i dyrkningen, som giver det højeste og mest sikre udbytte og af højeste kvalitet og værdi. Eksisterende viden bl.a. fra dansk forskning har vist, at der er stor variation til stede i amerikansk ginseng, og sandsynligvis tilsvarende for koreansk ginseng. Indtil for få år siden er der tilsyneladende ikke noget sted i verden foretaget nogen bevidst og videnstyret selektion eller forædling af plantematerialet, der fortsat består af åbentbestøvede populationer. Selektion og sortsdannelse er dog i gang i Korea (standardisering og sortsbeskrivelser i UPOV) og forædling af mere sygdomsresistente planter er i gang i USA. Potentialet fra tidligere dansk forskning viser at udbytter sandsynligvis kan øges markant, men at der er behov for at beskrive modeller og metoder for denne forbedring og de forskellige muligheder der foreligger.

Formål

Ved DJF AHP er en selektion i amerikansk ginseng startet allerede i 2000 og muligheden for, at udnytte dette plantemateriale i en fremadrettet udvikling af selektionsmetoder har været oplagt i dette projekt. Nærværende delprojektet har fokuseret på, at vise at man ud fra en flerårig, her 6 år gammel beplantning, kan udvælge de største rødder i hvilesæsonen, og genplante dem til videre frøavl. Herudover var det målet, at vise at det er muligt, at udtage en repræsentativ rodprøve fra hver af de største rødder før genplantning og analysere den for koncentrationen af indholdsstoffer, således at det bliver muligt, at udpege hvilke af de største rødder, der også har den højeste koncentration og mest ønskelige fordeling af aktive indholdsstoffer. Herved kan foretages en selektion for både rodstørrelse og koncentration af indholdsstoffer samtidig, som potentielt kan give et meget stærkt løft i den genetiske betingede plantekvalitet og udbytte af aktivstoffer.

Det var også af stor interesse at få viden om hvorvidt store rødder generelt havde lavere koncentrationer af indholdsstoffer eller en anden fordeling af indholdsstoffer end mindre rødder. Hvis dette var tilfældet kunne selektion for størrelse alene være problematisk mens uafhængighed mellem rodstørrelse og koncentration af indholdsstoffer ville være en stor fordel, og tillade en enkel selektion for rodstørrelse alene uden frygt for reduceret koncentration.

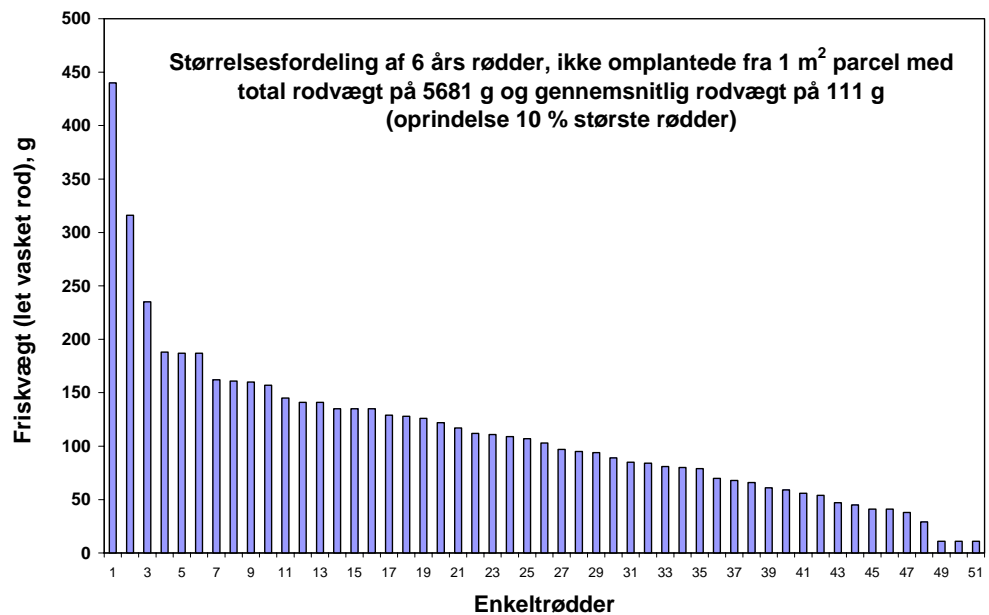
Metode

I foråret 2005 blev opgravet ca. 20 m bed med planter, der stammede fra de 10 % største ét-årige rødder udplantet i 2000. Disse planter har tidligere vist sig overlegne i tilvækst i forhold til øvrige ginseng bede med mindre optimalt udgangspunkt (10 % næststørste rødder og andre specialelektioner). De forsigtigt opgravede rødder blev vasket forsigtigt under håndbruser med blød børste for, at fjerne jord fra rodooverfladen. Rødderne blev rystet fri for overskydende vand og overflade tørret i nogle minutter før friskvægten af hver intakt rod blev registreret. De ca. 200 største rødder efter vægt blev mærket med id. nr. på sløjfeetiket for at identificere de 50 allerstørste rødder, der samtidig var sunde og med veludviklede knopper. Af disse 50 største rødder blev en større siderod brækket eller skåret af helt inde ved hovedroden, vejjet og placeret i løst lukket plastpose med rodens id. nr. for at undgå udtørring. Disse blev lagt på køl ved 4°C indtil start af ekstraktion og biokemiske analyser. Resten af hovedroden blev yderligere overfladetørret i få minutter for at lukke sårfladen let og derefter også placeret på køl ved ca. 2°C indtil rødderne blev genplantet i et nyrenoveret bed ca. 1 måned efter optagning. Genplantning ville optimalt skulle foregå lige efter (få dage) måling så rødderne var oppe af jorden i så kort tid som muligt. Optagningstidspunktet blev af arbejdsmæssige grunde også først udført omkring 1. maj, mens det optimale tidspunkt for optagning og genplantning vurderes, at være noget tidligere, helst i starten af april før knopperne starter stræking, og så der opnås et normalt udspring og en lang normal vækstsæson efterfølgende. Dette bør give den mest sikre overlevelse og videre vækst af disse testrødder. Registreringer i forsommeren 2006 viste, at ca. 8 % af de i alt 200 genplantede rødder var angrebet og dræbt af svampeangreb, mens de øvrige rødder havde overlevet dog med varierende kvalitet i skudvæksten.

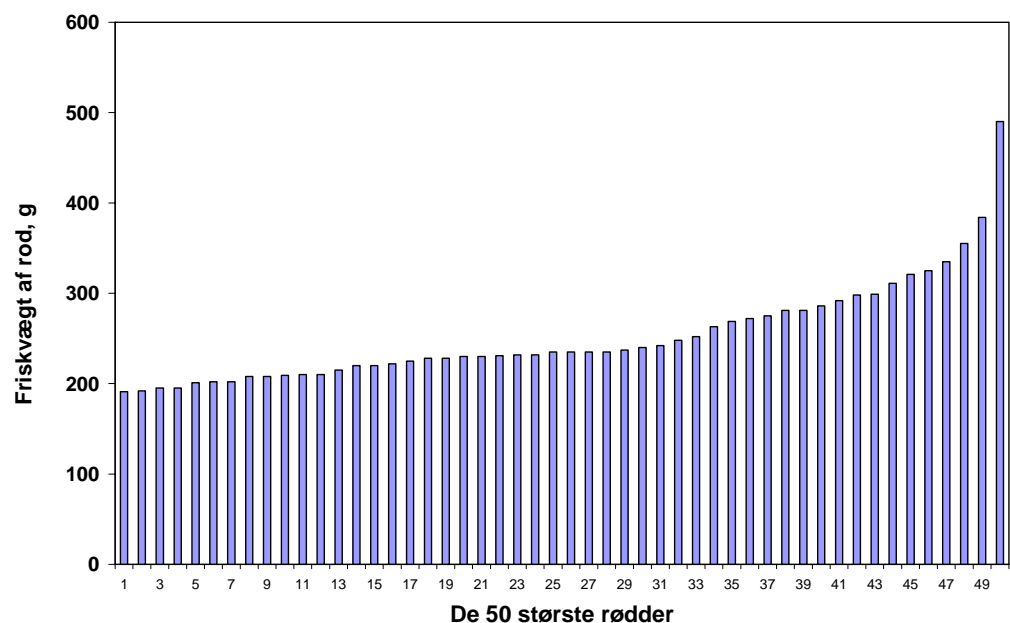
I foråret 2004 blev der gravet rødder op fra 3 bedparceller af 1 m², som blev vejjet og genplantet kort tid efter optagning. Disse planter overlevede alle omplantningen og voksede normalt videre med den undtagelse at plantehøjden var stærkt reduceret. Dette skyldes formodentlig at skudstrækningen var i gang ved omplantningen.

Det er derfor ret sikkert, at det kan lade sig gøre, at omplante større rødder og at successen vil være større hvis processen gennemføres lidt tidligere i foråret. Hvorvidt processen kan gennemføres om efteråret med held vides ikke.

De 50 største rødder repræsenterer de 0,5 % største rødder af en oprindelig population på over 11.000 ét-årige planter. Vægtfordelingen i en fuld population af rødder fra 1 m² bed er vist i figur 10.1 mens vægtfordelingen af de 50 største rødder er vist i figur 10.2.



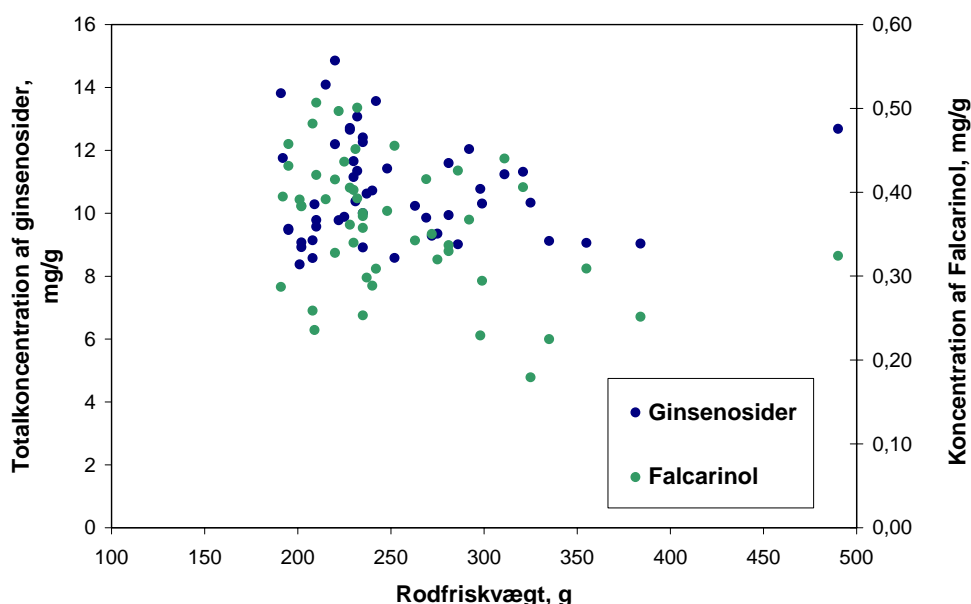
Figur 10.1. Størrelsesfordeling af alle rødder fra en 1 m² bedparcel med oprindelse i de 10 % største rødder ved udplantning i 2000. Rødderne er størrelsessorteret med faldende rodfriskvægt mod højre for at lette overblik.



Figur 10.2. Fordelingen af friskvægt i de 50 største rødder, der indgår i analyser af indholdsstoffer. Rødderne er sorteret med øget friskvægt mod højre.

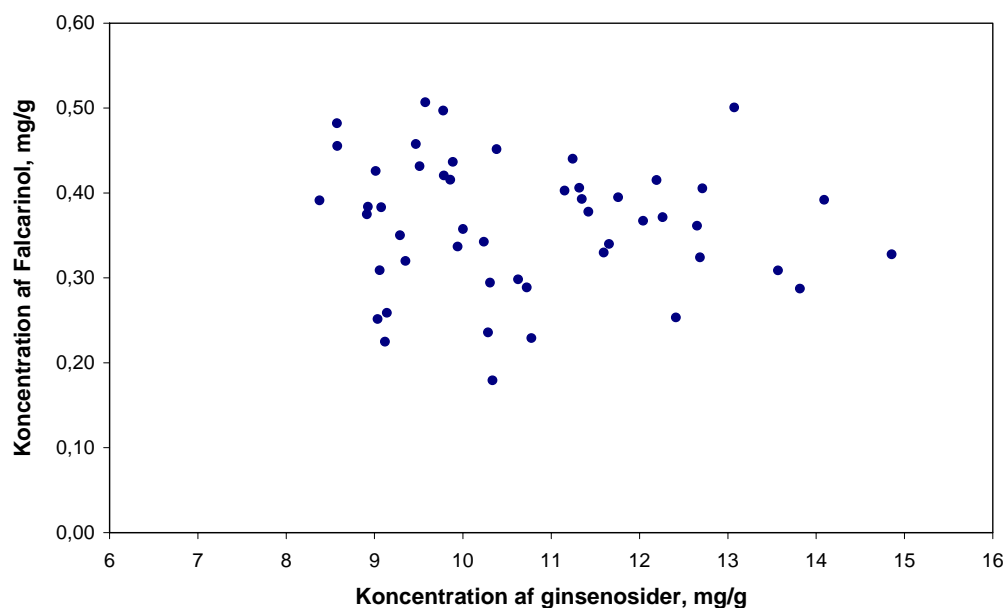
I et sideløbende studie blev det vist, at koncentrationen ikke varierede signifikant mellem mellemtykke og helt tykke rødder, og koncentrationen af de mellemtykke rødder i prøverne anses derfor som et sikkert æstimat for koncentrationsniveauet i hele roden, og kan dermed anvendes til, at 'ranke' røddernes koncentrationer.

Hver rodprøve fra de 50 største rødder blev ekstraheret efter standardmetode (se delprojekt 5) og analyseret for koncentrationen af de mest forekommende ginsenosider og de to mest forekommende polyacetylenere. Data præsenteres i de følgende figurer.



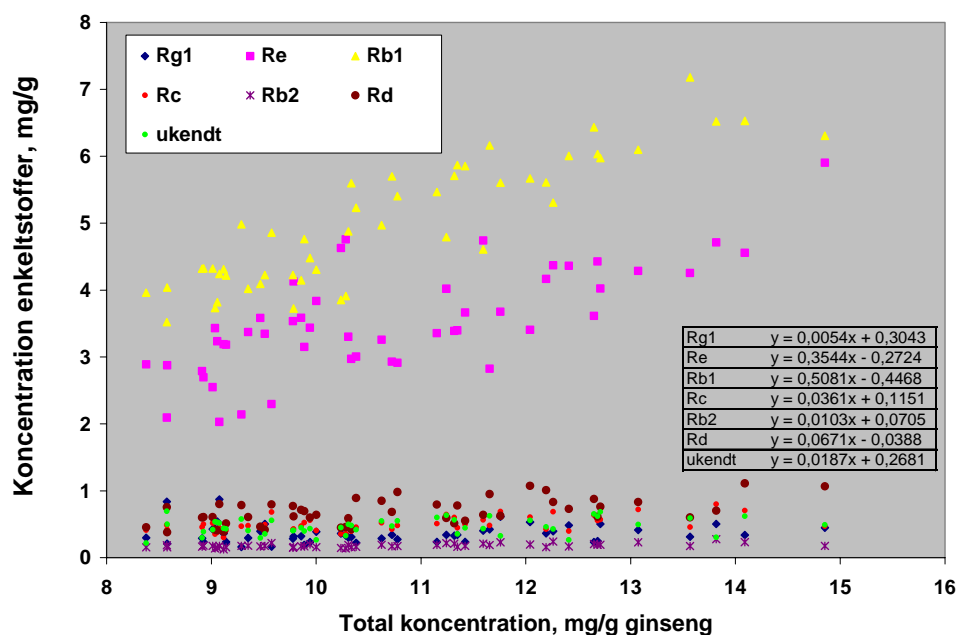
Figur 10.3. Totalkoncentration af ginsenosider og polyacetylenet Falcarinol i forhold til friskvægten af de 50 største rødder.

Der er enten ingen eller kun en svag tendens til reducerede koncentrationer af aktivstoffer med øget rodstørrelse. Dette betyder, at man kan selekttere for store rødder uden per definition, at risikere reducerede koncentration af indholdsstoffer i disse store rødder. Dette giver mulighed for en 'On farm' selektion af de største rødder ved høst, som så genplantes til videre frøavl, hvorved man løbende øger tilvækstpotentiallet i sit plantemateriale. Spredningen i koncentrationerne i figur 10.3 er meget stor, ca. en faktor 2-2,5 ved samme rodfriskvægt og der er derfor stor mulighed for selektion af forbedrede planter med højere koncentration af indholdsstoffer. Dette kræver dog specifikke biokemiske analyser af udvalgte store rødder ('Off farm' special selektion). Da rodfriskvægten også varierer fra ca. 200 g til næsten 500 g i denne undersøgelse (gennemsnit rodvægt i normal populationen var 111 g, se fig 10.1.), er der altså mulighed for, at selekttere meget store rødder til videre avl her. Kombineres de største rødder med de højeste koncentrationer af indholdsstoffer kan, der teoretisk blive tale om en 4-6 dobling af udbyttet af aktive stoffer pr plante i de bedste planter (forudsat vegetativ formering). Frøformerings reducerer fordelene noget men vil principielt give et væsentligt kvalitetsløft hos afkommet.

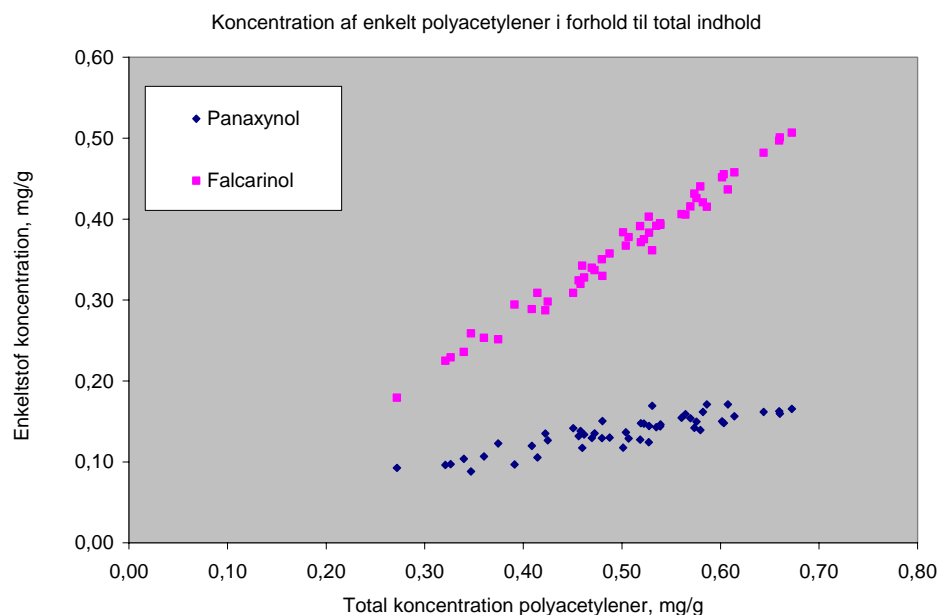


Figur 10.4. Sammenhængen mellem koncentrationen af Falcarinol og totalkoncentrationen af ginsenosider i enkeltrødder.

Figur 10.4 viser, at der ingen sammenhæng er mellem koncentrationen af de to stofgrupper ginsenosider og polyacetylenere, der heller ikke er syntesemæssigt beslægtet. Det vil derfor være nødvendigt, at teste for begge grupper såfremt man vil optimere på begge stofgrupper.



Figur 10.5. Korrelationer mellem koncentrationer af enkeltginsenosider og total ginsenosidkoncentration i enkeltrødder.



Figur 10.6. Koncentration af enkeltpolyacetylen i forhold til total koncentration.

Figur 10.5 viser, at Det primært er ginsenosiderne Rb1 og Re, der øges i de rødder, der har stærkt øget totalindhold af ginsenosider. De øvrige ginsenosider ligger ret konstant og meget lavt i koncentration. Dette betyder, at man principielt måske kan nøjes med, at teste for koncentrationen af disse to stoffer (Rb1 og Re) i forbindelse med søgningen efter rødder med højere koncentrationer. Det vil lette arbejdet og dermed prisen for sådanne selektionsanalyser noget.

Koncentrationen af de to polyacetylen stiger begge lineært (dog stærkest for Falcarinol) i forhold til total koncentrationen, og man kan derfor måske nøjes med at teste for den ene her.

Konklusion

Resultaterne har vist, at større rødder ikke har generelt lavere koncentrationer af indholdsstoffer end mindre rødder, og at det primært er Re og Rb1 ginsenosiderne der øges i rødder med højere total ginsenosid koncentration. Samtidig er der fundet en betydelig variation i såvel koncentration af indholdsstoffer og friskvægt af rødder, hvilket giver god baggrund for en videre selektion og forædlingsindsats.

På baggrund af resultaterne tegner der sig to modeller for selektion i amerikansk ginseng.

1. **'On farm' selektion** af store rødder ved høst til genplantning i frøplantage giver relativ billige forbedringer, og ny genetik tilføjes hvert år, så der løbende sikres bedste kvalitet. Enkeltpanter med uønskede egenskaber elimineres løbende.

2. **'Off farm' special selektion** af største planter/rødder med højeste indhold af bioaktive stoffer fra ovenstående genetiske pulje. Denne kræver dyre biokemiske test og kun et mindre antal planter kan testes. Der er behov for hurtig opformering af selekterede

moderplanter for etablering af stort frøproduktionsareal af forbedret plantemateriale. En sådan metode til formering fra få planter til mange ha er afgørende for implementering og udnyttelse af sådanne super planter. Somatisk embryogenese er en kendt vegetativ opformeringsmetode, som ved DJF er udviklet også på amerikansk ginseng. Teoretisk vil der kunne produceres millioner af ens nye planter på relativ kort tid (få år).

I selektion for større og bedre planter skal man altid huske:

- at selektere for alle andre vigtige egenskaber samtidig, herunder klimatilpasning og modstandskraft mod sygdomme og skadedyr.
- aldrig brug for små populationer/snæver genetik pga. risiko for indavlsdepression over tid
- bland forbedrede linier for at opnå heterosis effekt
- forbedre forhold for kydsbestøvning

11. Dyrkningsforsøg- metoder til at eliminere manuel ukrudtsbekæmpelse

Martin Jensen

Ginseng ukrudtsforsøg i nethus hos DJF

Der er ved DJF gennemført et mindre ukrudtsforebyggelsesforsøg af observationskarakter på flerårige planter.

Som flerårige planter benyttedes DJFs 6 årige planter i vestlige bed i nethus (7 vækstsæson).

I de ca. 20 m ginsengbed med planter, blev der udlagt forsøg med 5 hovedparceller uden gentagelser, med henblik på observationer af effekten af dækning med forskellige materialer på ukrudtsfremvæksten efter dækningstidspunktet. Det blev valgt at dække med et ret tykt lag materiale, da det var forventet at ginseng skuddene nemt kun gennemtrænge lagene. Dette blev i øvrigt bekræftet af forsøgene. Et ret tykt lag dækning er nødvendig hvis man skal undgå al ukrudtsvækst nedefra, så i ældre plantninger og i permanente frøavlslæg vil denne model kunne være mulig. Der er dog ikke regnet økonomi på om besparelsen i lugearbejde kan betale for det tykke dæklag.

Der blev lavet 4 typer dækkebehandlinger, som sammenlignedes med en udækket kontrol.

1. 4 m = halmdække, fint snittet halm (max 3-5 cm længde) i et ca. 8 cm tykt lag.
2. 4 m = sphagnum (Pindstrup 2) i et ca. 8 cm tykt lag.
3. 4 m = rent 'surt' kalkfrit, vasket sand i 5-6 cm tykt lag
4. 4 m = snittet elefantgræs (3-5 cm) i ca. 8 cm tykt lag
5. 3 m = Udækket kontrol med bar jord

Dæklagene blev udlagt lige efter, at bedet var luget rent.

Der blev observeret ukrudtsmængder flere gange i løbet af sommer, efterår, vinter og forårsperioden, for at vurdere effekten.

Resultatet beskrives her for de forskellige dæklag.

1. Halmdække. Sunket sammen til 5-7 cm tykt lag. Intet nyt frøukrudt spiret frem i sommer, efterår, vinter og forår. Kun et par små tidsler, en gederams plante og et par mælkebøtte i bedkanten blev fundet på de 4 m bed. Som ukrudtsbekæmpelse virker det fint. Plantefremspiringen vurderes at, være helt normal og uden hæmning og også plantevæksten er normal. Der var en lille tendens til at bladene vare lidt lyse, som sikkert hænger sammen med en svag kvælstof mangel, baseret på halmens langsomme omsætning og brug af kvælstof. Laget svarer til eller er lidt tykkere end normal dækning af ginseng bede med halm og den største forskel er nok, at halmen her var snittet i korte stykker og

dermed ikke hang så stærkt sammen. Planteskuddene kan derfor nok nemmere gennemtrænge det ret tykke lag.

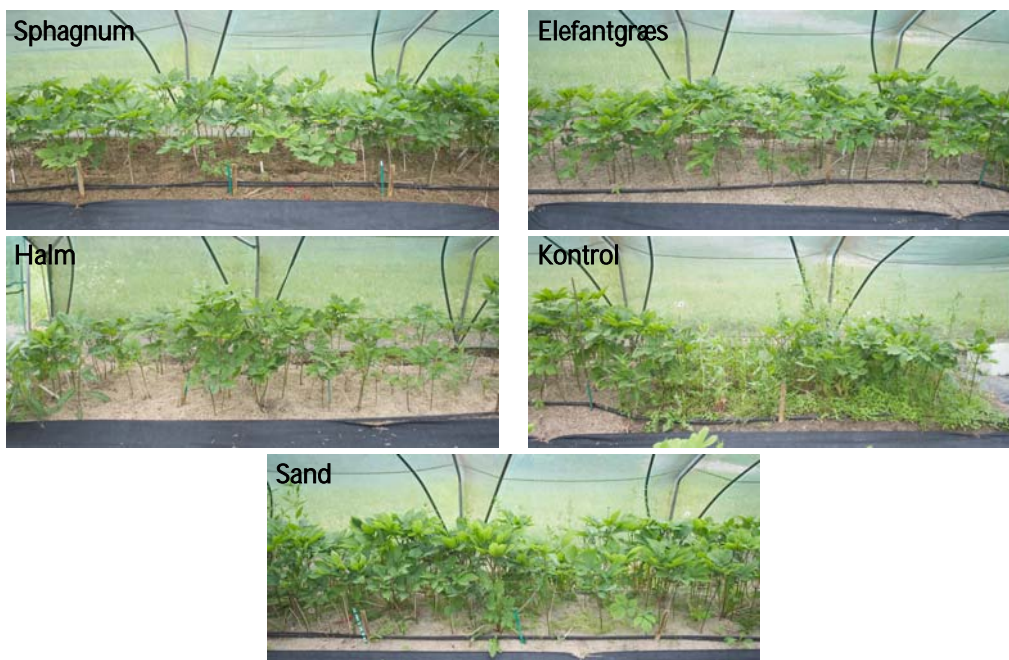
2. Sphagnum dække. Sunket meget lidt sammen til 7-8 cm tykt lag. Intet frøukrudt set og kun meget få rodukrudtsplanter (2 mælkebøtter og en døvnælde). Planterne var skudt meget fint igennem sphagnumen og var højde, bredkronede og dybgrønne i bladene. Gødningen i Pindstrup 2 blandingen har givet meget flotte planter. Meget effektiv ukrudtshæmmer.

3. Sanddække. Sunket sammen til 4-5 cm tykt lag. Der blev fundet en del nyspiret ukrudt (frø kan have været i sandet måske) og også en del flerårige ukrudter (lungeurt, mælkebøtter, dueurt, mv.). Enten har sandlaget ikke været tykt nok eller også forhindrer sandet ikke effektivt nok rodukrudt fremvækst. Ginsengplanter har skudt fint frem og står godt, men ser lidt lyse ud og trænger til kvælstof.

4. Snittet elefantgræsdække. Sunket til 5-7 cm tykt og ret kompakt lag. Intet nyspiret frøukrudt og meget lidt flerårig ukrudt (2 små mælkebøtter og 1 burresnerre). Ginsengplanter er kommet fint op og står fint. Skud er måske lidt kortere end hos sphagnum dækket, og løvet er også her lidt lyst (kvælstof mangel).

5. Kontrol udækket. Meget nyspiret og rigtig meget flerårigt ukrudt (min. 100-200 planter på 3 m bed) og eneste parcel med græsupkrudt. Ginseng planter står ok men er lidt lave og lyse, sandsynligvis pga. konkurrencen med ukrudtet om vand og næring.

På billederne ses de dækkede bede i juni 2006, hvor effekten på ukrudtsforebyggelsen er tydelig.



Konklusion

I ginsengplantninger fra 3 år og ældre vurderes snittet halm, snittet elefantgræs eller sphagnum i et dæklag på 7-8 cm, at være meget effektivt til, at forebygge ukrudtsfremvækst af både nyspiret og flerårigt ukrudt. Ginseng planterne er spiret fint frem og tåler dæklaget fint. Da dæklagene under nedbrydning forbruger kvælstof vil det være nødvendigt, at tilføre lidt gødning for, at opretholde planternes ernæring. Denne bør spredes ud før dæklaget ligges ud eller nedbringes igennem og under dæklaget i foråret før planterne springer ud (special udstyr). Endelig kan gødningen vandes ud og ned igennem dæklaget. Her kræves dog ofte større mængder. Der har ikke været vandmangel i de dækkede bede, som tværtimod vurderes, at holde på jordens fugtighed længe. Effekten på ukrudtsforebyggelse vurderes her, at holde i minimum et år og måske længere med halm og elefantgræs, der nedbrydes langsomt. Tilflyvende frøukrudt vil blive et problem på et tidspunkt, men i ovenstående netdækkede hus er tilførslen af frø udefra minimal.



Frøplanter af amerikansk ginseng

Frøbede

I foråret 2006 er udsået amerikansk og koreansk ginsengfrø på bede i nethus ved DJF. På nyrenoverede bede (fræset jord, sand, elefantgræsflis, sphagnum) blev der udlagt et ca. 2-3cm tykt lag rent sphagnum oven på det nyopsatte bed. Frøet blev sået på dette lag og derefter dækket med ca. 1-2 cm sand. Bedet blev vandet til efter såning.

Spiringen har været tilfredsstillende i bedet, men noget ukrudt er dog spiret frem, dog meget mindre end der vil være kommet i bede dækket med alm. jord. Igen kan det ikke udelukkes, at der har været ukrudtsfrø i sanddæklaget, som har øget ukrudtsspiringen. I tidligere forsøg ved Grønt Center var denne metode ret lovende, og det anbefales at man arbejder videre med afprøvning af denne teknik.

Nye og forbedrede metoder til stribedampning i sårækker (forsøg ved DJF Flakkebjerg) er også interessante for ginseng.

12. Sammenlignende dyrkningsforsøg med amerikansk og koreansk ginseng

Ole Have Rasmussen

Rapport fra Kongshave Ginseng

Formål

At undersøge vækstbetingelserne for koreansk ginseng i Danmark sammenholdt med amerikansk ginseng.

Hypotese

Erfaringen viser, at amerikansk og koreansk ginseng gror fint i Tyskland, USA og Østen. Snart 10 års danske erfaringer viser, at amerikansk ginseng også gror fint i Danmark. Det er derfor en nærliggende hypotese, at koreansk ginseng ligeledes ville kunne gro i Danmark!

Eksperimentelt

Kongshave Ginseng startede for alvor med, at dyrke amerikansk ginseng på friland under kunstig skygge i 2000, og har sået frø hvert efterfølgende år. I skrivende stund dyrkes både amerikansk og koreansk ginseng på Kongshaves jorde.

Fra og med 2001 har Kongshave hvert år tilsået stadig større arealer med koreansk ginseng (KG). I 2001 udgjorde KG 10 % af ginsengarealerne. I 2002 udgjorde KG 30 % af tilsåede arealer. I 2003 udgjorde KG 35 % af tilsåede arealer. Fra og med 2004 udgør KG 50 % af ginsengarealerne.

Resultater

Marken fra 2001 blev høstet i 2004. Her var udbyttet målt efter antal 3-årige amerikanske ginsengrødder langt større end for de koreanske rødders vedkommende.

Et stort antal stikprøver i mark fra 2002 viser, at antallet koreanske ginsengplanter per areal er langt mindre end for de amerikanske.

Mange stikprøver fra markerne sået i 2003 og 2004 viser nu, at antallet af koreanske ginsengplanter per areal er næsten lige så højt som for de amerikanske planter.

Diskussion

Det lave udbytte af koreanske ginsengrødder fra marken fra 2001 skyldes sandsynligvis, at frøene, som var importeret fra USA, havde været for lang tid undervejs (ca. 50 dage). Frøene blev forsinket flere måneder på grund af katastrofen den 11. september i New York. Dette understøttes af, at spireprocenten af de koreanske frø var meget lav i forhold til de normale 90-93 %. Det ligeledes lave antal ginsengplanter per areal i mark fra 2002 skyldes sandsynligvis, at denne mark har været placeret i et sted med meget vindpåvirkning. Dette argument kan begrundes med, at plantetætheden af amerikanske planter også er noget mindre i forhold de andre marker. Markerne fra 2003 og 2004 viser derimod ingen markant forskel i antallet af amerikanske og koreanske planter per areal. Disse marker er placeret et sted med mere læ.

Konklusion

Generelt kræver amerikansk ginseng skygge og læ i vækstperioden. Det er Kongshaves vurdering, at dette er endnu mere udtalt for koreansk ginseng. Det er også sandsynligt, at barfrost kan forklare frafaldet af nyspirede koreanske og amerikanske planter hvert forår!

Erfaringen viser også, koreansk ginsengfrø taber deres spireevne under for lang transport! En transporttid fra leverandør til ginsengavler på under to uger bevarer spireevnen af frøene på ca. 90-93 % for begge frøtyper.

Det må konkluderes, at koreansk ginseng kan gro i Danmark. Det må i den sammenhæng nævnes, at den sandsynligvis er mere sart og dyrere at producere, idet koreansk ginseng kræver længere tid for at opnå samme udseende som den amerikanske rod.

Kvalitative og udvalgte observationer i tabelform ved dyrkning af amerikansk og koreansk ginseng

Emne	Amerikansk ginseng	Koreansk ginseng	Forskel
Fremspiring af frø	Spirer i begyndelsen af maj	Spirer i begyndelsen af maj	Ingen
Tidspunkt for udvikling af modne bær	Slutning af juli	Slutning af august	Amerikansk ginseng udvikler modne bær ca. en måned senere end den koreanske.
Frostfølsomhed på fremvæksten af ginsengplanter i foråret	Sandsynligvis ja	Sandsynligvis ja	Ingen og planter bør nok vinterdækkes.
Svampeproblemer	Nej	Nej	Ingen
Spiringsprocenten af frø	Vurderes til ca. 90-95 %.	Vurderes til ca. 90-95 %.	Ingen
Frø sås i højbede	Ja	Ja	Ingen

Bladform	Grov i bladet	Fin i bladet	For det utrænede øje er der ingen praktisk forskel
Tilvækst i rødder	Tilvækst lidt langsommere end andre steder i verden. Skyldes nok at gødningsintensiteten er lav	Tilvækst lidt langsommere end andre steder i verden. Skyldes nok at gødningsintensiteten er lav	Amerikansk ginsengrødder er salgsklare når de er 3-4 år gamle, mens koreanske rødder har en tilstrækkelig størrelse når de er 5-6 år gamle.
Skadedyr	Agersnegle, knoporme?	Agersnegle, knoporme?	Ingen
Indkøb af frø	1000 kr./kg	4000 kr./kg	Koreanske frø meget dyrere end amerikanske frø
Sådybde af frø	1-2 cm	1-2 cm	Ingen

Her angives desuden nogle måleresultater fra bærhøsten (primo september) på 5-årige amerikanske ginsengplanter fra Kongshave Ginseng. Disse supplerer de opnåede data hos DJF vedrørende bærproduktion.

- 1) Ginsengplanter som gror i spagnumbede har givet 773 g bær/kvm. Plantetætheden er 40,5 planter pr kvm, hvilket svarer til ca. 21,3 gram bær pr plante. Antallet af planter er 156. Areal lig 3,8 kvm.
- 2) Ginsengplanter som gror i spagnumbede har givet 907 g bær/kvm. Plantetætheden er 47,5 planter pr kvm, hvilket svarer til ca. 20,4 gram bær per plante. Antallet er 115. Areal lig 2,4 kvm.
- 3) Ginsengplanter som gror i almindelig jord giver 485 g bær/kvm. Plantetætheden er 23 planter pr kvm, hvilket svarer til ca. 21,3 gram bær pr plante. Antallet er 82. Areal lig 3,6 kvm.
- 4) Ginsengplanter - avl i almindelig jord giver 304 g bær/kvm. Plantetætheden er 9,31 planter pr kvm, hvilket svarer til ca. 32,5 gram bær pr plante. Antallet er 95. Areal lig 10,2 kvm.

Add. 1 kontra 2: Forskellen mellem 1) og 2) er, at planterne i område 2) har fået fjernet blomsterstanden sidste forår. Det tyder altså på, at plantens forhistorie ikke spiller væsentligt ind på dannelsen af frugtstandens masse!

Add. 3: Det virker som om, at plantetætheden og jordtypen ikke spiller ind på massen af dannet frugtstand!

Add. 4: Avlsrødderne blev plantet sidste efterår. Avlsrødderne er udtaget efter masse, og udgør 10 % af de bedste rødder. Her ses klart, at det gennemsnitlige udbytte (ca. 32,5 gram/frugtstand) er langt større end normaludbyttet (ca. 20 gram/frugtstand). Merudbyttet er ca. 60 % større!

13. Indledende forsøg med potteplanter af ginseng

Marianne Jepsen, Martin Jensen, Poul Timmerman, Poul Mose, Palle Fabricius.

Forsøg med drivning af ginseng-rødder i væksthush.

Baggrund

I Årslev har der i de sidste 5-6 år været arbejdet med amerikansk ginseng, *Panax quinquefolium* L. DEG har herudover tidligere lavet et mini-produktudviklingsforsøg med få ginseng rødder, drevet frem i potter som prydeplanter.

I dette projekt arbejdes der videre med, at udvikle konceptet med ginseng som potteplante, på basis af udvalgte rødder fra Årslev der pottes op i skåle og drives frem som prydeplanter. Målet er salgbare planter med en skulpturel rod, med en spændende historie og et indhold af sundhedsfremmende stoffer. Desuden forsøges det, at udvikle en standardiseret metode til produktion af ginseng i hus i potter eller plugbakker, som frøplante og/eller flerårig kultur, på basis af frø fra DJF Årslev.

Formål

Projektet beskæftiger sig med to dele:

- Produktion af færdige potteplante til salg baseret på rødder af forskellige størrelse. Målet var at kunne sælge potteplanter med bær i august-september.
- Produktion af småplanter fra frø til viderekultur eller som mini potteplante i 1-2 års alder.

Forsøgsmetoder

Delprojekt 1: Produktionen af færdige potteplanter til salg baseret på rødder af forskellige størrelse

Produktionen af potteplanter foregik i to gartnerier henholdsvis Gartneriet Rosborg og Gartneriet Timmermann. Vi har valgt, at fokusere på gartneriet Rosborg, da resultaterne fra de to gartnerier ikke var væsentlig forskellige. Begge gartnerier fulgte den samme forsøgsplan, dog var der mindre forskelle i metoderne.

A) Metode:

Ginseng rødderne blev pottet den 2. juni 2005. Der var 50 rødder af fire forskellige størrelser, se nedenstående tabel. Rødderne blev plantet i Pindstrup 2 Specialblanding til Kalanchoë og i skålene TEKUCOTTA T23 og T27.

Tabel 1: Rodstørrelsen for de 5-års rødder, inddelt i 4 str. á 50 stk.

Størrelse af rod	Vægt	Størrelse af skål	Volume
1	29 g +/- 8 g	23 cm	2,5 liter
2	53 g +/- 12 g	23 cm	2,5 liter
3	92 g +/- 15 g	23 cm	2,5 liter
4	154 g +/- 21g	27 cm	4 liter

Det skal bemærkes, at rødderne pga. arbejdsmæssige forhold først blev gravet op sent i foråret lige omkring begyndende løvspring i starten af maj. Tilsvarende er rødderne pottet meget sent på året og har ligget barrods i kølerum i ca. 4 uger før plantning delvis på grund af manglende pottes. Dette har desværre påvirket resultatet meget negativt. Det vurderes, at en tidligere opgravning og potning vil have givet væsentligt bedre resultat.

B) Resultater

Ud af de 50 rødder pr. størrelse, der blev pottet, er det foreløbige resultat ved udgangen af juli samlet i tabel 2. Bemærk at rodstørrelse 4 er store rødder.

Tabel 2: Foreløbig opgørelse af forsøget den 2. august.

Rodstørrelse:	1	2	3	4
Antal skud fremkommet:	15	15	20	30
% skud af pottede rødder:	30	30	40	60
Antal salgbare planter:	5	5	5	10
% salgbare totalt:	10	10	10	20
% salgbare af fremkomne:	33	33	25	33

Ultimo august blev næsten alle rødder kasseret pga. tiltagende problemer med rådsvampe i toppen af rødderne (blødråd lige under skuddene). Rødderne blev kasseret pga. en fejl i forbindelse med ferieafløsning. De resterende planter havde på dette tidspunkt dannet frugtklaser, hvoraf nogle var ved at få en flot rød farve. Den 9. september blev der lavet status på de resterende planter. Ud af de oprindelige 200 rødder var der kun 36 planter tilbage.

Tabel 3: Opgørelse den 9. september

Rodstørrelse	1	2	3	4
Antal planter tilbage:	4	6	9	17
% "overlevende" planter:	8	12	18	34



Billede 1: salgsfærdig plante



Billede 2: Salgsfærdig plante med røde bær og synlig rod

C) Delkonklusion:

Produktionen af ginseng som potteplante viste sig, at være forbundet med en del problemer som resulterede i et ikke helt acceptabelt slutprodukt. Skud voksede skævt, og skud der knækker ved basis var lidt af et problem. En del planter fik krøllede blade, og de vedbliver at være krøllede. De skæve skud skyldes delvis at skudstrækning var i gang før potning og ikke har kunnet rette sig op efterfølgende.

Gartneriet Rosborg havde råd i flere af deres rødder. De fandt, at svampeproblemerne blev større jo mindre roden var fra starten. Gartneriet Rosborg havde pottet deres rødder så de næsten var helt dækket af spagnum. Hos Gartneriet Timmermann oplevede de ikke problemer med råd. De havde pottet ginseng rødderne højt i potterne, så de stak op over jorden.

Mange af planterne blev ret høje og det er nødvendigt, at finde en måde til, at reducere stilk længden. Strækningsvæksten sker meget hurtigt efter at rødderne er pottet op, så man skal være opmærksom på det fra starten. Det bør overvejes, at regulere strækningsvæksten vha. f.eks. tørkestress.

Produktion og drivning af ældre rødder passer ikke ind i de to gartneriers produktion da udsigten til, at vente 3-4 år er for lang tid for dem. Kan 3-4 årige rødder købes til en fornuftig pris i foråret og den færdige potteplante sælges i efteråret er det tidsmæssige problem mindre.

Delprojekt 2: Produktion af småplanter fra frø til videre kultursvarer eller salg som specialprodukter i 1-2 års alder.

Produktionen af småplanter fra frø foregik i tre gartnerier. Foruden de to tidligere nævnte gartnerier deltog Palle Fabricius også.

A) Metode

Til produktion af Ginseng planter blev frø som var høstet i DJFs plantning anvendt. Frøbehandlingen varede 10-12 måneder og frøene kunne først sås den 30. juni 2005. Uden for projektregi ville man normalt så i april eller først i maj.

I alt blev 12.788 frø (840 gram) fordelt i 3 forskellige typer såbakker:

7 cm potter i 54 huls bakker (2 jordtyper)	~ 216 planter/m ²
77 huls speedlingbakker	~ 325 planter/m ²
96 huls speedlingbakker	~ 400 planter/m ²

Såning i 7 cm potter foregik direkte på Rosborg Krydderurter's formeringsborde á 1.312 stk den 30. juni 2005. Speedlingrammerne blev placeret ovenpå bordene. Potter/rammer blev fyldt med jord og tilvandet. Efter manuel såning den 30. juni 2005 blev bordene stablet i spirerummet. Efter forspiring ved lidt lavere temperatur i spirerummet end i væksthuset, blev bordene den 13. juli flyttet til efterspiring i formeringsarealet. Alle såbakker og potter blev tilvandet med Bactimos og Vectobac. Fremspiring er ret spredt og ikke særlig stor den 1. august. Det skal bemærkes at det var en meget varm periode med høje temperaturer i væksthuse, som ginseng frø er kendt for ikke at kunne tåle ret godt i spirestadiet. Alle frø/småplanter blev flyttet til et koldhus, afd. Rughøj den 5. august.

I forsøget er brugt to jordblandinger. Pindstrup 2 Specialblanding til Kalanchoë 10 cm (standard i forsøget) og Kekkila (kun 1/3 af 54 huls behandlingen). De bruges normalt til krydderurter.

Potter	1 bord Kekkila-jord (Kek jord) og 2 borde Kalanchoë-jord (Kal. jord).
Bakker	VEFI pluggbrett VP 77 og VP 96. Pluggvolumen: 0,063 og 0,053 liter.
Spirerum	15 °C i 14 dage i mørke, stablede borde, til ca. 10 % fremspiring, så Formering 15-25 °C (hedebløge) i 3 uger, trempelskygge

Ultimo august: pga. den ringe fremspiring (ca. 20-25 %), blev rammerne kun opstillet efter behandling (plantetæthed) og uden gentagelser. Der blev kun vandet med mellemste gødningsniveau i alle behandlinger.



Billede 2: Frøplanter



Billede 3: Frøplante med rod

B) Resultater

I tabel 4 er fremspiringen af planterne opgjort. Fremspiringen er generel lav og muligvis har jordtypen en indflydelse. Det kunne se ud som om, at Pindstrup 2 Specialblanding til Kalanchoë 10 cm giver en lidt bedre fremspiring end fremspiringen i Kekkila-jord. Dette skal dog tages med forbehold da flere frø er sået i Pindstrup 2 Specialblanding til Kalanchoë 10 cm.

Tabel 4. Foreløbig opgørelse af fremspiring den 9. september 2005

Bakke type:	54 huls Kek. jord	54 huls Kal. jord	77 huls Kal. jord	96 huls Kal. jord
Antal frø sået:	1.312	2.624	7.700	1.152
Antal frø spiret:	273	614	1.591	300
Spireprocent:	20,8 %	23,4 %	20,7 %	26,0 %

Tabel 5. Antal frøplanter ved afslutning af forsøget ultimo september.

7 cm potter i 54 huls rammer	887 planter
77 huls speedlingbakke	1.591 planter
96 huls speedlingbakke	300 planter
I alt	2.778 frøplanter til "salg"

C) Delkonklusion:

Ud af de 12.788 frø der blev sået i Gartneriet Rosborg blev 2.778 til frøplanter der kunne sælges. Dette svare til, at kun 21,7 % af samtlige frø blev til frøplanter.

Ultimo september besluttede Gartneriet Rosborg, at stoppe med projektet og at afhænde plantematerialet. Plantematerialet kunne ikke afsættes, inden der gik efterår i bladene. Småplanterne forsøges afsat til foråret, når det nye løv er sprunget ud.

Gartneriet Timmermann høstede rødderne i uge 48. Disse rødder vil de potte op til foråret og forsøge at sælge dem som 1. års planter. De overvejer at fortsætte med, at så ginseng i små potter og så sælge dem som 1. års planter.

Supplerende bemærkninger

Samme frøparti af amerikansk ginseng, som blev spiret hos Rosborg og Timmerman blev også sået ud hos Palle Fabricius blot lidt senere, hvor frøet var forspiret yderligere før såning. Her blev spireprocenten anslået til, at være meget højere end hos Rosborg. I Spireanalyser hos DJF blev spireprocenten opgjort til over 80 % i laboratoriet under kontrollerede betingelser. De høje temperaturer under fremspiring har derfor reduceret spiringen væsentligt i de to gartnerier, mens det forspirede frø hos Palle har givet meget bedre spiring. Tidligere forskning hos DJF har vist, at frøspiring er følsom for høje temperaturer der kan hæmme spiring og evt. inducere hvile i frøene igen. I så forsøg hos DJF er der oftest opnået høje spireprocenter når der sås optimalt med temperatur og skygge mv. Det dårlige resultat i nærværende undersøgelse er derfor en konsekvens af, at forholdene ikke har været optimale. De frø, der spirede frem, har dog vokset fint videre resten af sæsonen (ingen eller få døde) og givet en acceptabel kvalitet af 1 års rødder. Tidligere såning sidst i april ville dels give lavere temperaturer til spiring og dels give længere vækstsæson så øget tilvækst og større rødder kan opnås. Salgsmæssigt skal unge planter nok sælges enten 1-2 måneder efter spiring eller først i det følgende forår lige efter udspring. På disse tidspunkter har man det friskeste og sundeste udseende og en efterfølgende vækstperiode hos forbrugeren.

Efterskrift:

Både Poul Timmerman og Palle Fabricius har sået nye frø i foråret 2006 og forsøger, at videreudvikle og forbedre dyrkningen og afsætningen af små ginseng planter. Hos Kongshave Ginseng, er der i efteråret 2005 og vinteren frem til foråret 2006 arbejdet med, at udvikle en udplantningsvare, dvs. en plast æske med en levende ginseng rod i dvale, som i foråret kan udplantes i forbrugers have til videredyrkning. Dette produkt er slået pænt igennem og Kongshave Ginseng arbejder videre med, at udvikle og afprøve dette system.

Det skal yderligere bemærkes, at det danske gartneri Spiren, som ikke har været en del af dette projekt, har sendt et stort pottепrodukt med ginseng på markedet i foråret 2005, hvilket bekræfter at interessen for et sådant produkt er tilstede og at det kan produceres.

Som støtte for en videre dansk dyrkning, herunder af koreansk ginseng er der skabt kontakt til avlere i Jilin i Kina, hvor der er købt frø af både amerikansk og kinesisk ginseng (koreansk).

Det er desuden vist, at det er muligt at købe renvaskede, vægtsorterede 4-6 år gamle rødder af begge arter fra Kina til videre dyrkning i Danmark til en fornuftig pris. Importen af rødder kræver eksport og importtilladelser for amerikansk ginseng (CITES beskyttelse mod ulovlig handel) og sundhedscertifikat for begge arter. Koreansk ginseng er ikke CITES beskyttet.

På billederne ses en miniplug med ung ginsengfrøplante og en supersize pottепlante med dekorative rødder over jorden baseret på 4-6 år gamle og store rødder af amerikansk ginseng.



Variation i ginseng potteplanters udseende afhængig af rodens placering delvis over eller under dyrkningsmediet og stænglens ikke lineære form fremkommet på baggrund af det sene omplanthningstidspunkt. En synlig rod er ønskelig for at bidrage til æstetikken.

14. Etablering af genbank af ginseng arter

Det er lykkedes at få planter af tre ginseng arter og frø af en fjerde art, som nu er i spiring. De fleste af de øvrige ginseng arter er ikke almindelige i dyrkning, og kræver særlige kontakter eller indsamling i naturen.

Panax ginseng	Frø og planter fra Jilin provinsen, Kina
Panax quinquefolius	Frø og planter fra Nordamerika og Jilin provinsen, Kina
Panax japonicus	Planter fra dansk samler
Panax japonicus var major	Frø fra professor Guo Baolin, IMPLAD, Beijing, Kina

15. Identifikation af dansk process- og forarbejdningsudstyr til ginseng

Jannick Nøddekær, Palle Møldrup, Martin Jensen, Martin Jørgensen, Torben Madsen.

Baggrund og mål

Ud fra viden om tekniske behov for procesudstyr fra mark til færdig droge er der et ønske om, at identificere nødvendig dansk teknologi (apparatatur/maskiner til høst, vask, tørring, forarbejdning, ekstraktion, formulering mv.) og lokalisere de danske firmaer, der potentielt vil kunne tilbyde, at løse de forskellige opgaver ved håndtering af rødder/bær mv. af ginseng. Et godt overblik over disse muligheder og hvad der evt. mangler vil give bedre mulighed for at avlere, at finde samarbejdspartnere og eller vurdere behovet for egne investeringer i udvikling af teknologi.

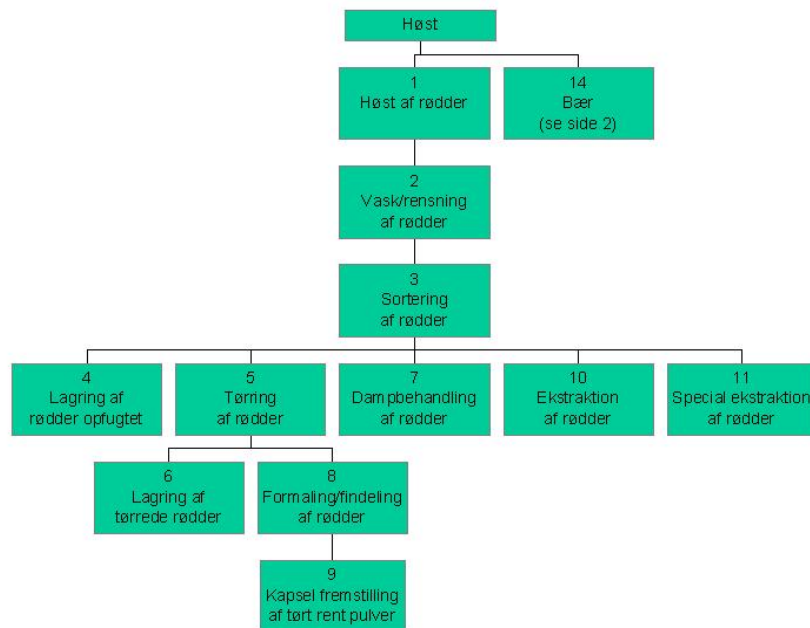
Rapporten er opdelt i en række kronologiske procestrin (se proces diagram), som hver indeholder 3 delbeskrivelser.

- A. Først omtales behovet for hvert procesled med angivelse af status af produktet før og efter processen og beskrivelse af de almindeligt anvendte metoder og teknikker for ginseng
- B. Derefter angives der forskellige mulige/bedre/nye tekniske løsninger, herunder behov for udvikling af nye metoder samt kommentarer til effektivitet og økonomi af metoderne.
- C. Herefter listes en række danske firmaer, der kan tilbyde denne tekniske proces ekspertise dels som lønopgave og dels som maskinfremstiller.

Rapporten består derfor af en række delafsnit/procestrin, der giver hurtig mulighed for at orientere sig om en enkelt proces og dens muligheder. Procestrinene vil naturligt blive af forskelligt omfang på baggrund af forskellig viden niveau og ikke alle delprocesser har givet anledning til kommentarer.

Sidst afsluttes med en konklusion, med forslag til strategisk videre udvikling og forskning på teknologisiden. Disse er tænkt at kunne pege på fremtidige projekter/ erhvervsmæssig eksport af teknisk løsninger til verdensmarkedet for ginseng og andre lignende urter.

Ginseng forarbejdning - oversigtsdiagram



15.1. Flow diagram for behandling og forarbejdning af ginseng rødder.

Gennemgang af proceskæde.

Rødder

1. Høst af rødder

- A. Generelle Processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Høst af rødder bør først foretages efter at plantetoppen er visnet helt ned og altid efter bærhøst. I princippet kan rødder høstes hele vintersæsonen hvis jorden ikke frostbindes. Der kan dog ske ændringer i indholdsstoffer mv. i løbet af vinteren, samt indtræffe sygdomsangreb mv. og derfor anbefales det generelt at høste i efteråret, som er det normale. I Danmark vil høsten ofte kunne foregå fra sidst i september til start af november. I små parceller vil man ofte benytte spader til forsigtig opgravning af rødder. I større arealer benyttes der maskiner til høst. Der bruges typisk kartoffeloptagere eller løgfrilæggere i modificeret udgave til, at tage rødderne op. Før høst vil man oftest fjerne visne stilke (evt. grønthøster), evt. halmdækning på bedene (modificeret halmpræsser der opsamlet og fjerne halmrester kan overvejes), samt fjerne den kunstige skygge hvilket medfører, at jorden tørrer lidt mere ud og dermed gør det nemmere at løfte rødderne uden skader. Optagning er nemmest fra hævede bede. Rødderne vil oftest placeres i storkasser (f.eks. æble storkasser) eller bakker og skal fra marken direkte til vaskning. Udtørring før vask gør det vanskeligere, at fjerne al jord.

Mekaniseret høst med maskine vil forudsætte en jord der er rensat for større sten forud for produktionsstart (stenstrengslængning). Desuden betyder jordens fugtighed meget for hvor let jorden falder fra rødderne under optagning og dermed gøre vask nemmere. Afhængig af udstyr og effektivitet køres der ofte over arealet 2 gange for at få de sidste rødder med.

Udbytter kan ligge fra gennemsnitligt godt 3 tons tørrede rødder pr ha til op mod 5,4 tons pr ha. Dette svarer til henholdsvis ca. 11 til knapt 18 tons friskvægt af rødder pr ha.

B. Da rødderne skal vaskes og senere sorteres og tørres, kan det overvejes om håndteringen i transportkasser mv. direkte fra høsten kan tilrettelægges således, at der bliver så lidt manuel håndtering eller omlæsning af rødderne som muligt i de videre processer. Dette for, at sparer ressourcer men også for at skåne rødderne mod skader. Det bør overvejes om der er nogen fordel i, at foretage en grovsortering af rødder allerede på optager båndet eller ved opsamling.

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces.

Erfaringerne fra høst af rødder viser, at der i princippet kan anvendes de fleste typer af kartoffeloptagere og løgfrilæggere, der betyder at rødderne bag efter kan samles op eller automatisk placeres i storkasser. Det kan være Kongskilde eller andre mærker.

D. En dansk produktion skal som udgangspunkt anvende højt mekaniseret høst for, at være rentabel. Tilstedeværende dansk udstyr vurderes, at kunne tilgodesee en moderne høst proces evt. med mindre modificeringer.

2. Vask/rensning af rødder – desinficering af materiale

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Vaskning skal foretages umiddelbart efter opgraving og skal naturligvis benytte rent vand, uden kemiske eller biologiske forureninger. Ulempen er, at friskopgravede rødder ofte har en meget følsom overflade, der nemt skades. Nogle avlere venter derfor et par dage med at vaske rødderne, der herved får en lidt sejere overhud og tåler vask bedre. Små partier af rødder kan spules på et net, hvor jorden forsvinder nedenunder. Større partier vil oftest blive maskinvasket. Hvis der er større jordknolde, der sidder fast på rødderne, kan rødder lægges i vand nogle timer før vaskningen, således at knoldene opløses. Herved kan den værste jordmængde også skilles fra før rødderne kommer i vaskeren. Der findes flere modeller af vaskemaskiner, som typisk er net-tromlebaserede med vandspuleenheder, hvor rødder bevæges rundt og spules fra alle sider. Vaskemaskiner er typisk kontinuerlige procesenheder, hvor rødderne transporteres igennem under vask. Batch vaskemaskiner findes også. Det er afgørende at rødderne skades så lidt som muligt under vaskeprocessen.

B. Ingen særlige kommentarer.

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces

Der findes udstyr til vask af både kartofler, gulerødder og andre rodfrugter i fødevarereprocesindustrien, og disse forventes, at kunne anvendes til ginseng også. En anden mulighed kan være, at købe brugt udstyr i udlandet eventuelt i Nordamerika/Canada.

D. Potentialer for videreudvikling af teknikker er lille i dansk produktion af ginseng, og eksisterende apparatur vurderes, at kunne tilpasses ret nemt til ginseng industri i udlandet.

3. Sortering af rødder (før og efter tørring)

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces)
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Sortering af rødderne har flere formål og vil typisk blive gjort flere steder i processen af rødderne. Syge, rådne og svampeinficerede rødder bør så vidt muligt kasseres i marken ved optagning. Efter vaskning bør rødderne sorteres igen for sygdomme eller evt. skadede rødder. Dette kan enkelt gøres ved, at lade rødderne passere på et sorterebånd hvor der sorteres manuelt. Ønskes en sortering i forskellige størrelser, rodfaconer eller lign. kan dette også gennemføres her. Størrelsessortering før tørring har den fordel, at rødder af samme størrelse kan tørres samtidigt, hvilket giver en mere ensartet nedtørring og bedre kvalitet af rødderne.

Yderligere sortering kan også foretages efter tørring. Form kan have meget stor betydning for pris i hvert fald i Asien. Her klippes de rødder, der ønskes formet efter bestemte former. Det afklippede kan gå til ekstraktion.

Skal rødderne alene bruges til ekstraktion er størrelsessortering og bortsortering af knækkede rødder osv. irrelevant, og alene syge rødder frasorteres.

B. Her forelægger der allerede kendte teknologier til erstatning af håndsortering.

Eksempel herpå er postsortering af breve og pakker efter postnummer, selv når postnummeret er skrevet med håndskrift. Et andet eksempel er sortering af brædder og træstykker på savværker. Disse to eksempler benytter sig af 2-D billedanalyse. Ved sortering af rødder kan det blive nødvendigt med 3-D billedanalyse.

Fælles for sådanne computerstyrede sorteringsanlæg er, at de er meget dyre, og det må antages, at man skal op på 200 til 300 driftsdage om året, før sådanne anlæg er rentable.

C. Ingen bemærkninger

D. I danske forhold er manuel sortering nok mest relevant for nuværende. Da visionsteknikker og automatiseret sortering er dyre teknikker der kræver specielt udvikling, vil det kun være relevant i meget store centrale ginseng produktionsområder i verden, der kan udnytte denne teknologi. Markedet for teknologi vurderes, at være meget begrænset, og en udvikling skal derfor gøres sammen med specifikke avlere/grupper af avlere i verden.

4. Lagring af rødder opfugtet

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Det er muligt, at lagre rødder i frisk tilstand efter optagning, dels med henblik på optimerer udnyttelse af vaske- og tørringsfaciliteter, dels med henblik på akkumulering af større mængder før en evt. ekstraktion. Endeligt kan lagring af friske rødder give mulighed for et salg af friske rødder over en længere periode uanset om formålet er plantemedicin /kosttilskud eller evt. videre kultivering til pryddplanter. Temperaturen bør ligge mellem 0-5 °C og i jo længere periode, det ønskes at lagre rødderne, jo lavere bør temperaturen sænkes mod de 0°C. Da Canadiske undersøgelser tyder på, at rødderne først begynder at blive skadet ved omkring -4°C og først dør helt ved -12°C, kan det måske være muligt, at lagre ved temperaturer lidt lavere end 0, f.eks. ned til -2 eller -3°C og stadig bevare fuld livskraft i rødder samt uændret kvalitet. Luftfugtigheden i et kølerum bør være over 80 % (RH) for, at forsinke udtørring af rødderne og gerne endnu højere. Canadiske resultater har vist, at rødderne kan opbevares i op til 6 uger uden kvalitetstab mens danske observationer ved DJF tyder på, at lagring er mulig i endnu længere tid. Rødder pakket i tyndt lag i kasser og placeret i delvis lukkede plastposer ved ca. 2°C har holdt sig friske i adskillige måneder uden udtørring.

Da svampesygdomme (gråskimmel og diverse rodråd) kan spredes kraftigt på kølelager, anbefales det at sortere alle smittede rødder fra før lagring, samt at overflade tørre rødder let før indlagring for at minimere risikoen for en epidemisk spredning af svampe under lagring. Det er nødvendigt at holde godt øje med kvaliteten under længere tids lagring, så der løbende kan gribes ind ved problemer. Ved længere tids lagring af friske rødder vil knopperne på en del af rødderne begynde at skyde og få lange stængler (over 3-4 måneders lagring for efterårsopgravede rødder, men efter få uger til en måned for forårsopgravede rødder). Skal skudbrydning holdes tilbage skal temperaturen sænkes ned mod 0°C. Skal rødderne genplantes til videre dyrkning anbefales det, at undgå udtørring af rødderne. Svag gummiagtig tilstand menes ikke, at være skadelig men der er ikke foretaget undersøgelser over hvor grænsen for nedtørring er i relation til videre vækst. Selve lagringen kan gøres med rene rødder alene, eller alternativt med rødder lagt ned i sand eller sphagnum i lag. Anvendelsen af medium adskiller rødderne fra hinanden og undgår derfor en hurtig smitteoverførsel og beskytter samtidig bedre mod udtørring. Det må sikres, at der ikke opstår iltmangel i de nederste rødder.

Efterårsoptagne rødder er i hvile og knopperne kræver mindst 3-4 måneders kuldebehandling ved 1-5°C for at ophæve hvilen og tillade at knopperne bryder. DJF har tidligere vist, at en sådan kuldebehandling af rødder i sand kan foretages i kølerum efterfulgt af udplantning af rødder når knophvilen er ophævet.

For hurtigt at køle rødder ned til lager temperatur kan det overvejes, at dyppe rødderne i en kold væske som meget hurtigt vil sikre en lager temperatur. Dog skal rødderne efterfølgende overfladetørres effektivt ved den lave temperatur ved kraftig ventilation.

B. Et kuldager er i princippet en isoleret varmeveksler, hvor temperaturen holdes nede ved hjælp af et kølelement (fordamperen i et kompressorkøleanlæg) og holdes ensartet ved hjælp af ventilatorer. Rummet modtager varme dels fra omgivelserne, dels fra de aktiviteter, der foregår i rummet, dvs. fra ventilatorer, der kører af og til eller døgnet igennem, og fra belysning, åbning af døre, transportmidler og personer, når der arbejdes i rummet. Som en tilnærmelse regner man med, at udviklet varme skal fjernes i de perioder, hvor der arbejdes i rummet.

I kølerum vil vegetabiliske produkter for det meste være levende væv, der ånder og dermed udvikler varme.

Den frigjorte varme svarer til 2,78 MJ per mol forbrugt monosaccharid.

Hastigheden, hvormed åndingen foregår, er meget forskellig, fx efter produktets art, vandindhold og temperatur. Ved 20 °C har man for tørt korn, frugter og grøntsager åndingshastigheder svarende til en varmeproduktion i størrelsesordenen 0,01-0,1 W per kg vare.

På grund af dannelsen af stofskifteprodukter må luften i kølerum med vegetabilier ofte udskiftes. Luftskiftets omfang bestemmes af, hvor store mængder af uønskede stofskifteprodukter, der dannes – og kan tolereres. Ofte er den bestemmende faktor dannelsen af carbondioxyd ved ånding. Den foregår med en hastighed, svarende til dannelsen af nogle få mg carbondioxyd per kg vare per sekund, og der tolereres for det meste 0,5-1 % carbondioxyd i luften.

D. Ønsket om, at anvende friske rødder til videre kultivering (udplantningsplanter) og til prydplanter, stiller krav til at lagring af friske rødder videre udvikles. Herunder vil forbedret holdbarhed af friske rødder i salgspakninger ved højere temperaturer være af interesse (butikshyldeliv). Som et delelement er transportbetingelser af friske rødder over længere afstande og tidsrum til ovenstående produktion også et indsatsområde, der skal løses.

Japanske undersøgelser har vist, at friske ginseng rødder lagret ved 0 °C i plastposer med defineret permeabilitet for CO₂ og O₂, samt tilførsel af nitrogen (Modified atmosphere packaging, dvs. lavere O₂ og højere CO₂ end normalt) lagrede bedre i op til 150 dage ved 10 °C end rødder lagret i almindelig atmosfære i fugtig sand. RH var ca. 95-98 % i poserne og røddernes indhold af ginsenosider blev kun reduceret med få procent efter lagringen. Formålet med ovenstående undersøgelser var, at forlænge hyldetid for friske varer og det blev ikke undersøgt om rødderne kunne gro videre efter denne lagringsform. Dypning af rødder i en væske med antibakteriel eller antifungal effect er også vist, at forlænge holdbarheden af friske rødder.

5. Tørring af rødder (evt. findeling før tørring)

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Næsten alle rødder til anvendelse, som kosttilskud eller plantemedicin tørres til mellem 8 og 10 % vandindhold (friskvægtbasis) for, at sikre at de er lagerstabile, dvs. at de ikke angribes af primært diverse lagersvampesygdomme og at nedbrydning/henfald af

rødderne (f.eks. enzymatisk nedbrydning eller åndingstab) med tab af kvalitet ikke kan foregå eller foregår med meget lav frekvens. Ved det lave vandindhold kan rødder lagres i lang tid og nemt transporteres uden væsentlig tab af kvalitet.

Hvis rødder af alle størrelser tørres samtidig vil små tynde rødder typisk 'overtørres' når de store tykke rødder er nået ned på de 7-8 % vandindhold. Vandholdet i de små rødder kan så f.eks. være nede på 4-5 %. For at undgå dette delvist kan rødderne grovsorteres i størrelser før tørring. Dette vil give mere ens vandindhold i rødderne og vil potentielt kunne give kortere tørretid. Da alle større rødder også har små rødder, vil en total sortering dog ikke være mulig. Rødder med diameter mellem 29 og 35 mm tørrede til 10 % vandindhold efter 10 dages tørring, mens rødder fra 11-13 mm diameter nåede ned på 4.27 % vandindhold på samme tid. Man anvender i praksis ofte en 'snap test' som et mål for om rødderne er tørre nok. Rødderne skal knække med en 'snap' lyd, der indikerer at de har opnået en sprødhed som korrelerer med vandindholdet. Vandindholdet ved en god 'snap rating' varierer fra ca. 5,5 % i små rødder mindre end 7 mm op til 7,5 % i rødder over 17 mm i diameter.

Selve tørreprocessen afhænger af temperatur, luftfugtighed og ventilation i tørrerummet. Resultater har vist, at ginseng ikke tåler at blive tørret ved for høje temperaturer og tilsvarende kan miste kvalitet ved tørring ved for lave temperaturer. Temperaturer under 30°C kan give grønlig misfarvning af rødder, mens temperaturer over 40 °C kan give brunlig misfarvning af rødder. Denne brunfarvning bliver stærkere ved højere temperaturer, men afhænger også af vandindholdet. F.eks. giver tørring ved 50°C ikke brunfarvning, hvis den kun anvendes når vandindholdet er under 55 % i rødderne og i bestemte tørringsintervaller. Mens en konstant temperatur på 38°C vurderes at give optimal kvalitet, giver en tørringssekvens på 38 -50-38 °C ligeså god kvalitet hvis de 50°C først anvendes når rødderne er under 55 % vandindhold. Denne metode giver 40 % kortere tørretid. I kommerciel canadisk ginseng tørring ved ca. 35-38°C tager det typisk op til mindst 13-18 dage at tørre et parti rødder, afhængig af partiets størrelse og tørremetoder.

For at kunne udtørre rødderne kræves, at luftens fugtighed er så lav at den er under det ligevægtsvandpotentiale som rødderne har ved et givent vandindhold. Rødders ligevægtsvandindhold ved en given relativ fugtighed og temperatur afhænger af rodstørrelser mm. Generelt kræves en RH under ca. 55-60 % for, at komme ned på mellem 8 og 9 % vand i ligevægtssituationen efter langvarig tørring. Ved hurtig tørring skal RH derfor sænkes yderligere. I Canada tørres ofte ved mellem 20-30 % RH i de professionelle tørrerier, mens 40 % RH anbefales som et sikkert niveau, der ikke giver overtørring af små rødder.

Det er fordelagtigt at sikre en god ventilation i tørreanlægget for, at sikre en ensartet nedtørring af alle rødder. Herudover vil ventilation kunne sikre en hurtig udskiftning af fugtig luft, hvorved tørreprocessen gøres hurtigere. Selve udtørringen fra rødderne kan i et vist omfang øges ved ventilation især ved meget våde rødder, men når udtørringen ved lavere vandindhold mere bestemmes af vandtransporthastigheden inde i roden vil øget ventilation ikke øge udtørringen væsentligt. Især ved store mængder rødder på et begrænset tørreareal er det kritisk at sikre god og ensartet ventilation.

Ventilationshastigheder på 0,7 fod/sekund angives som almindelig i Canadiske anlæg. Der lægges op til ca. 12-15 cm tykke lag rødder i tørrebakker.

Tørring foregår i praksis på meget forskellige anlæg afhængig af produktionens størrelse. Lufttørring på metal net i overdækkede arealer er benyttet i områder hvor luftfugtighed og temperatur tillader en tørring, mens større produktion næsten altid vil have deciderede tørreanlæg. Plantørreanlæg eller andre tørreovne med let opvarmet evt. tørret luft, der blæses op gennem netbakker med tynde lag af ginseng rødder bruges udbredt.

I den Canadiske ginseng produktionsvejledning fra British Columbia, er der angivet en del detaljer omkring tørring af ginseng herunder opbygning og funktion af tørringsudstyr. Ovenstående tørreovne er typisk batch processer nok mest pga. den lange tørringstid. Afhængig af opbygning kan en ovn dog anvendes som kontinuert, hvis man kan tage de mest tørre ud og få nye rødder ind i den rigtige rækkefølge.

Nyere undersøgelser har undersøgt muligheden for, at kombinere tørring med varm luft med infrarød varme, og resultater tyder på det måske kan gøre tørringen hurtigere end varm luft alene.

I flere undersøgelser er det vist, at tørring oftest medfører et tab af total ginsenosider (i nogle undersøgelser op til 25 % mindre end i friske rødder), samt at koncentrationsfordelingen af enkeltginsenosider skifter efter tørring. Det er derfor afgørende at sikre en dokumenteret proces og kvalitet efter tørring. Frysetørring af ginseng ser ud til at kunne minimere tabet af ginsenosider væsentligt (tab på kun ned til 1-2 % er set).

B. Så længe der er tale om tørring af hele rødder, er det energioekonomisk billigst at lade rødderne tørre på åben mark, eller dertil indrettet betonplatform.

Hvis vejret ikke tillader denne form for tørring, eller der ønskes højre hygiejniske forhold, er næste skridt, at tørre i tørrerum med ventileret luft. Her anbringes rødderne i bakker med bunde af stålnet.

På dage med høj relativ luftfugtighed vil det være nødvendigt med opvarmning af luften.

Hvis det kan accepteres, at rødderne bliver stødt og en stor del af rodspidserne knækker af, vil det være muligt at anvende en tørretromle. En fordel ved tørretromlen er, at den vil kunne installeres så det er nemt at skifte mellem batch- og kontinuert drift.

Det anbefales, at arbejde med et planlagertørringsanlæg hvor rødderne ligger i et lag på trådhylder, der muliggør luftgennemstrømning og hvor tørring foregår ved relativ lav temperatur.

Ved andre former for kontinuert tørring, f.eks. tallerkentørrer eller div. former for fluid bed-tørrer, vil det være nødvendigt at findele eller formale rødderne først.

Det skal bemærkes, at det energi økonomisk er meget dyrt at fjerne vand ved tørring med varmt luft. Der bliver brugt ca. dobbelt så meget energi for, at fjerne et kg vand ved tørring sammenlignet med et kg vand kogt af en gryde. Der er derfor en mulighed for økonomiske besparelser i, den optimale indstilling af forholdet mellem lufttilførslen og varmetilførsel i forhold til den relative luftfugtighed i ind og ud luften.

Der vil være mulighed for udvikling af en ny proces, hvor man kombinerer tørring og varmebehandling af rødderne. Se del afsnit 7b.

Vacuamtørring

En af grundene, til at man bruger vacuum, er, at man kan anvende lavere og mere skånsomme temperaturer over for varmemfølsomme produkter.

I et ***vacuumtørreskab*** har man hule hylder, hvorpå varen anbringes i tynde lag.

Varmemediet cirkuleres gennem de hule hylder, da man på grund af det lave tryk ikke kan anvende konvektion. Fjernelsen af vanddamp sker her ved hjælp af kondensatorer, som blot er varmevekslere, hvor man lader meget koldt vand cirkulere i rør, på hvis yderside vanddampen kondenserer. Metoden anvendes til meget temperaturfølsomme produkter, fx frugtsaftkoncentrater.

En ***vacuumbåndtørrer*** består af en evakueret beholder, hvor der kører et endeløst bånd over to tromler, en varm og en kold. Desuden tilføres varme ved stråling. Produktet sprøjtes på båndet, og den tørrede vare skræbes af med knive. Denne metode anvendes bl.a. til frugtsaftkoncentrater (incl. tomat) og til kaffeekstrakt.

Tilsvarende kan tromletørring naturligvis også foregå under vacuum med samme vandfjernelsessystem som nævnt under vacuumtørring.

For at forbedre varmeøkonomien har man forsøgt med diverse vacuumtørre, som delvis erstatning for kondensatoren, men systemerne bliver ofte meget kostbare.

Frysetørring

Kombinationer af frysning og tørring anvendes til metoderne frysetørring og dehydrofrysning.

Princip. Ved frysetørring fjernes vandet ikke ved fordampning, men ved en sublimering, dvs. en direkte overgang fra is til vanddamp. Den nødvendige lave temperaturindebærer en meget skånsom behandling af produktet, fx undgås i vid udstrækning denaturering af proteiner, og der opnås en bedre bevarelse af aromastoffer. Samtidig bevares varens struktur, oven i købet i en porøs form, som er med til at give en god rehydreringsevne.

Frysetørringen omfatter to særskilte processer:

- A. Frysning af varen, som kan foregå i traditionelt indfrysningsudstyr eller i selve vacuumkammeret.
- B. Sublimering af vandet, der skal foregå ved et damptryk lavere end tripletpunktet, som regel ved ca. 0,5-2 mm Hg, svarende til -25 til -10°C.

Principielt består frysetørringsapparatet af de i skitsen i figur 15.2. viste enheder:

- A. Et vacuumkammer med tilhørende vacuumudstyr.
- B. Et varmesystem, der kan tilføre den frosne vare den nødvendige sublimationsvarme. Her er vist anvendelse af ledning, men det kan være en kombination af strålevarme og ledning.

- C. En kondensator til fjernelse af den dannede vanddamp. Temperaturen i denne "frysefælde" holdes ofte på -50°C for, at få en tilstrækkelig diffusionshastighed af vanddampen, idet den drivende kraft er forskellen i vanddampptrykket ved henholdsvis produktets og frysefældens temperatur.
- D. En kølemaskine. Denne kan enten være en mekanisk flertrinskompressor eller et flertrinsabsorptionsanlæg. Det sidste anvendes, hvor man har billig brændsel, eller hvor man ønsker at undgå kompliceret mekanisk udstyr med mange bevægelige dele.

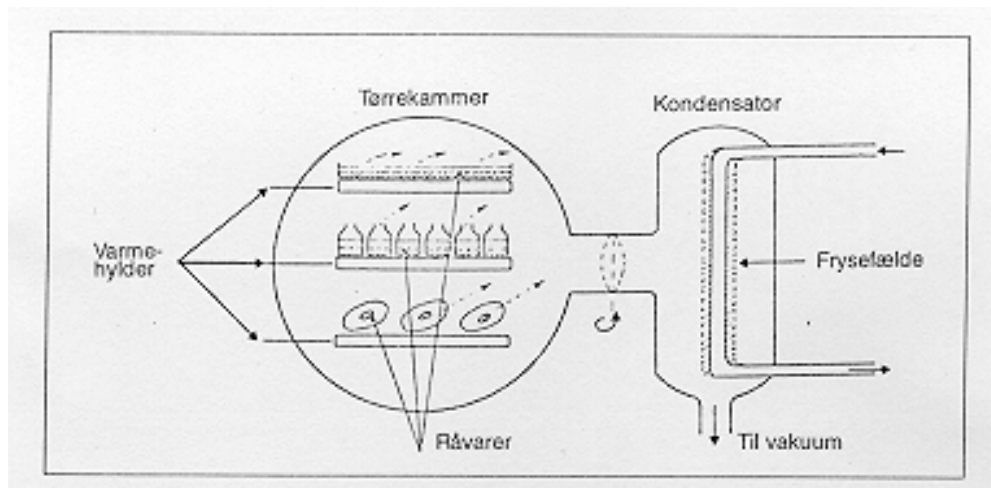


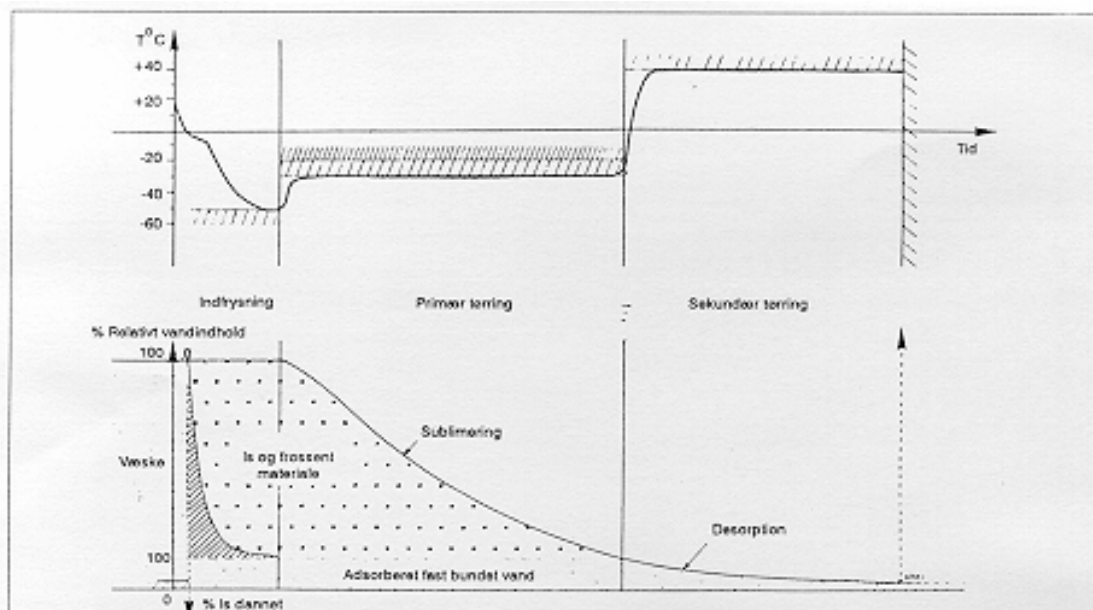
Fig15.2. Frysetørningsprincip

Teknologi.

Indfrysningsmetoden er af meget stor betydning ligesom temperaturen, hvorunder frysetørringen foregår. Sker indfrysningen meget hurtigt, vil der ikke ske en udfrysning af større iskristaller med dannelse af kanaler, når isen er sublimeret. Denne kanaldannelse vil øge transporthastigheden af vanddamp. Er temperaturen for høj under tørringen, vil der være "lav" viskøse områder (ikke amorfe områder). Deres mekaniske stabilitet er ringe, hvorfor strukturen kollapse, når der opstår store trykforskelle på grund af væskestrømning i produktet under tørringen. Man taler decideret om en karakteristisk kollapsestemperatur. For at opnå et godt produkt skal man altså foretage indfrysningen med meget store frysehastigheder, og man skal sørge for en meget lav temperatur under tørringen.

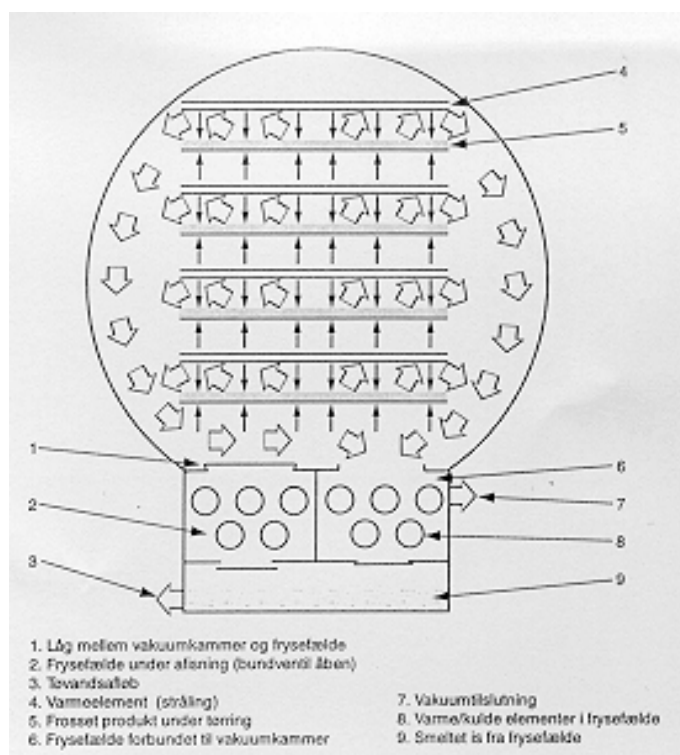
Aromabevarelsen er ofte god, og det skyldes ikke blot, at der arbejdes ved lave temperaturer, men nok så meget at aromakomponenterne adsorberes på det allerede tørrede materiale under transporten ud fra sublimerationsfronten.

I store anlæg sker opvarmningen ofte ved, at varen placeres i bakker på hule hylder, hvorigennem man så kan cirkulere enten et frysemedium eller et varmemedium, afhængigt af hvor i processen man befinder sig. I mindre anlæg foregår opvarmningen ofte elektrisk med varmetråde indlagt i massive hylder. Problemet er, at holde temperaturen i varen så lav, at isen ikke smelter og samtidig tilføre så meget varme, at sublimationen sker med en rimelig hastighed. Efter at isen er fjernet (det frie vand), vil der i nogle produkter være noget "bundet" vand, som afdampes til slut. Temperaturforløbet samt ændringen i vandindhold og -tilstandsform ved en frysetørningsproces er skematisk vist i figur 15.3.



Figur 15.3. Temperaturforløbet samt ændringen i vandindhold og -tilstandsform ved en frysetøringsproces

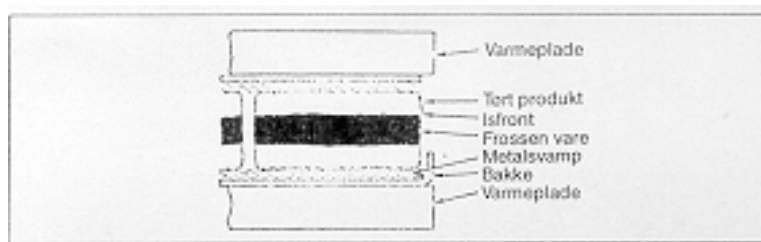
Opbygningen af et større industrielt anlæg er vist i figur 15.4. Her er der to kamre med kondensatorer, et aktivt, hvor vanddampen kondenserer, og et under afrimning, hvor kondensatoren isoleres fra vakuumkammeret, og den kondenserede vanddamp optøes og tømmes af. Herefter køles kondensatoren ned og gøres til den aktive, ved at låget vippes/skydes over til isoleringen af den anden kondensator.



Figur 15.4. Industrielt frysetøringsanlæg

Et specielt system, AFD (Accelerated Freeze Drying), anvender opvarmning ved ledning fra to sider (hule hylder med varmemediet). For at sikre afgang af vanddamp indskydes en metalsvamp mellem vare og hylder, se figur 15.5. Da den er af metal, sikrer den god varmeledning, men den begrænsende faktor er oftere varmeledning i den allerede tørrede del af produktet.

Opvarmningen kan endvidere ske ved hjælp af mikrobølger, men her er problemet, at is ikke absorberer strålingen så godt som flydende vand. Man risikerer derfor nemt overhedning med smeltning til følge.



Figur 15.5. Metalsvamp opbygning

En anden måde at accelerere tørringen på er ved, at lade trykket pulser. I stedet for, at arbejde med et konstant lavt vacuum arbejdes der med en cyklisk proces med skiftevis højt og lavt vacuum. Herved opnås, at vanddampen bringes i bevægelse og tørretiden kan nedbringes til under det halve.

Udformningen af frysetørningsanlæg varierer fra skabsfrysetørnere / til portionsvis produktion) til store kontinuerlige anlæg, fx udformet som tunnelfrysetørningsanlæg. Både anlægs- og driftsomkostninger er meget høje ved frysetørring.

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces

Dyrker	Kontakt person	Kommentar
Ryegaard Gods	Johan Scheel, Ejer	Har på nuværende tidspunkt et ginseng projekt. / egen tørring
Løkkegaard	Lars T. Sørensen	Dyrker, vasker, tørrer og snitter lægeurter
Grønt Center	Poul Madsen	Kassetørningsanlæg. Arbejder med gas. Er forholdsvis dyrt

D. Da tørringsprocessen er både dyr og krævende for bevaring af kvalitet, er der muligheder for forbedringer af apparatur og behov for mere viden om konsekvensen for de aktive stoffer.

Såfremt rødder skal tørres til formaling eller til fremstilling af ekstrakter, bør det overvejes om rødderne kan snittes eller findeles til ensartede små fraktioner før tørring, da det vil gøre processen meget hurtigere og give mere ensartet tørring. Evt. bivirkninger ved snitning før tørring skal dog afklares først.

Der findes en lang række industrigrener, der anvender tørring og diverse tørringsudstyr og det anbefales derfor, at sondere mulighederne bredt.

6. Lagring af tørrede rødder

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Tørrede rødder kan pakkes i lufttæt emballage (eks. kraftigt plastfolie eller aluminiumsfolieposer) og opbevares køligt i lang tid uden væsentlig nedgang i indholdsstoffer.

Da vekslende luftfugtighed kan give øgning af vandindhold og dermed øget ustabilitet er det afgørende, at emballagen er lufttæt. Da iltning af stoffer er en af de vigtigste nedbrydende processer i tørt plantemateriale, vil pakning af rødder uden ilt og i stedet med f.eks. nitrogen sandsynligvis kunne forebedre tørlagring. Selv ved lagring under højere temperaturer sker der kun et langsomt tab af ginsenosider i rødderne. Australske forsøg med lagring af formalet tørt pulver ved 10 % RH ved 5, 20 eller 35 °C i op til 12 uger viste, at der kun sker en svag nedgang i totalconcentrationen af ginsenosider ved de høje temperaturer efter de 3 måneder. Mens de neutrale ginsenosider ikke synes påvirket af lagringen ved de høje temperaturer skete der et kraftigt fald i malonyl ginsenosiderne, som dels blev nedbrudt og dels konverteret til neutrale ginsenosider ved 35°C. Der er derfor en god holdbarhed og kvalitet selv under hyldebetingelser, såfremt materialet er pakket og behandlet korrekt.

Der er meget mindre viden om hvad der sker med de øvrige bioaktive stoffer i ginseng, eks- polyacetylen, under tørring og lagring.

Lys kan ofte nedbryde indholdsstoffer og det anbefales derfor, at lagre rødder eller pulver mørkt.

B. Se afsnit tidligere om kølelagring af friske rødder.

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces. Ingen kommentarer

D. Ingen kommentarer

7. Dampbehandling af rødder + andre specialbehandlinger.

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Dette er en behandling, der har været kendt i Asien i flere hundrede år og anvendes i en vis udstrækning på koreansk ginseng og giver den karakteristiske "røde" ginseng. Dampbehandling (steaming på engelsk) må ikke forveksles med en kortvarig blanchering. Dampbehandlede rødder har normalt bedre holdbarhed fordi alle bakterier og svampe er elimineret. Den vigtigste effekt er dog en ændring af indholdsstoffer mod et mere potent produkt. Friske rødder dampbehandles typisk ved 100 eller 120°C i op til 2-4 timer evt. under tryk i autoklave, hvorefter rødderne farves kraftigt rødbrune. Rødderne tørres oftest efter denne behandling eller ekstraheres. Der er i 2003 udtaget patent på en ny behandlingsmetode af et koreansk firma, der har fundet at tilsætning af ren ilt til over 50 %

i atmosfæren med 1 atmosfæres tryk i autoklaven ved 100 °C i 3 timer giver hurtigere og bedre brunfarvning og dermed mindre tab i generel kvalitet og udbytte af rødder af koreansk ginseng. Effekten af dampning på indholdsstofferne er delvist undersøgt. Under dampbehandlingen fremkommer en række nye ginsenosider, som ikke findes (eller ikke kan detekteres) i friske rødder eller tørrede hvide rødder. Bl.a. Rg3, Rg5, Rk1, Rs5 og Rs4. Flere af disse stoffer er vist, at være kraftigt celle toksiske på visse typer af cancer celler. Et kinesisk firma bliver angivet, at have produceret en anticancer medicin på baggrund af Rg3. Australske forsøg har vist at malonyl ginsenosider forsvinder næsten helt efter 3 timers dampning af amerikansk ginseng og at totalkoncentrationen falder med øget antal timers dampning.

Dampbehandling af ginseng rødder er interessant da det kan blive basis for nye produkter og muligheder i værdiforøgelse af ginseng.

B. Der er umiddelbart 3 metoder til dampbehandling af rødder.

1. Batch proces ved brug af en autoklav.
2. Batch eller kontinuert proces ved brug af fridamp fra en dampgenerator.
3. Udvikling af en ny proces, hvor man kombinerer tørring og varmebehandling af rødderne.

En ny proces, hvor man kombinerer tørring og varmebehandling af rødder, vil kunne udvikles som både batch og kontinuert proces.

Processen vil i alt sin enkelthed gå ud på at tørreluften recirkuleres i et lukket kredsløb.

Inden tørreluften, i det recirkulerede kredsløb, kommer i kontakt med rødderne opvarmes luften af et varmelegeme. Efter kontakt med rødderne afkøles luften i en partialkondenser, hvorefter luften igen opvarmes af varmelegemet.

C. Ingen bemærkninger

D. Dampning af ginseng giver mere potente stoffer og kan være af interesse for videreudvikling af mere specifikke lægemidler mod f.eks. cancer. Kemisk/enzymatisk modificering af ekstraherede ginsenosider vil evt. kunne erstatte dampbehandlingen i fremtiden ved fremstilling af disse special ginsenosider. Området er kun lidt undersøgt og mulighederne og interesserne store.

8. Formaling/findeling af rødder

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. En del salgsvare af ginseng består af standardiseret ginsengpulver i kapsler eller tabletter.

For at opnå denne vare skal tørrede ginseng rødder formales til et fint pulver, der skal sigtes og finrenses for uønskede partikler eller ikke formalede plantedele. Processens effektivitet og kvalitet af produktet afhænger af bl.a. vandindhold i varen, en evt. opdeling i mindre enheder før formaling og kvaliteten af råvaren, herunder ensartethed, farve, alder

mm. En forknusning af større rødder kan komme på tale for, at sikre et mere ensartet processforløb. Det er afgørende at rødderne er rene og ikke indeholder sten som kan beskadige møllen. Færdigt formalet eller findelt rodmaterial skal pakkes lufttæt umiddelbart efter formaling for, at hindre nedbrydning af stoffer. Der er ikke viden om hvordan formaling påvirker alle aktive stoffer i ginseng, herunder polyacetylen.

B. Der findes en række leverandører af møller og snitter, som vil kunne tilbyde apparatur i forskellig skala.

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces

Det skal understreges, at formaling klart anbefales at finde sted efter tørring. Findeling kan f.eks. finde sted med ved hjælp af en skivemølle for, at opnå det ønskede pulvermateriale. Det frarådes, at anvende findelingsmetoder med for høj temperatur for, at undgå at man mister de attraktive indholdsstoffer. Ved langvarig drift kan møller bilve så varme, at det vil påvirke produktet. Her kan køling blive aktuelt.

Herunder er nævnt en forarbejdningsvirksomhed, som måske har kompetencer indenfor formaling/findeling af plantemateriale der ligner ginseng.

Virksomhed	Kontakt person	Kommentar
Dan Blends A/S Rybergsvej 1 5631 Ebberup Tlf: 64 74 22 88 Fax: 64 74 22 18 E-mail: danblends@danblends.com www.danblends.com	Morten Duch, Direktør	Produktion- og pakkekapacitet til halvfabrikata eller færdigvarer inden for fødevarerområdet. Bl.a spraytørring med tilknyttede lagertanke, opløsningsudstyr, pasteuriseri-ning, filtrering, m.m. Pulverbehandling fx formaling, blanding, sigtning og pakning.

D. Ingen bemærkninger

9. Kapsel fremstilling af tørt ren pulver/findelt materiale

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Kapsel og tablet fremstilling er pga. krav om dosering et vigtigt område for meget plantemedicin og kosttilskud. Her vil ikke blive nævnt detaljer, og der henvises i stedet til de respektive firmaer som har kompetencer indenfor området.

B. Hvis ikke der er tale om en meget stor produktion, vil det mest rentable være, at lade kapsel fremstillingen udføre som lønarbejde hos en af udbyderne af denne ydelse.

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces

Der kan peges på flere virksomheder, der har produktionsudstyr hertil. Det er ikke sikkert, at alle nævnte er indstillet på at udføre lønarbejde.

Paramedical A/S Vassingerødvej 3-7 3540 Lynge Tlf: 48 18 93 44 Fax: 48 18 93 83 E-mail: info@paramedical.dk www.paramedical.dk	Karen Christensen, farmaceut	Fremstiller helseprodukter bl.a. Longo Vital. Laver muligvis kontraktarbejde for andre.
Winther Medico A/S Højager 3-5 5270 Odense N Tlf: 66 18 91 91 Fax: 66 18 88 40 E-mail: info@winthermedico.com www.winthermedico.com	Bent Winther, Direktør	Udvikling og fremstilling af farmaceutiske produkter og helseprodukter herunder kosttilskud, vitamin- og mineralpræparater og urteekstrakter. Ud over egne produkter producerer ligeledes i lønarbejde.
Camette A/S Lillebæltsvej 47 6715 Esbjerg N Tlf: 75 47 05 55 Fax: 75 14 50 52 E-mail: camette@camette.dk www.camette.dk		Dansk medicinalvirksomhed som udvikler, producerer og markedsfører lægemidler, medicinalvarer, kosttilskud og naturlægemidler, kosmetik og cremer samt homøopatiske artikler. Tilbyder innovative produkter udviklet og produceret efter de nyeste videnskabelige principper.
Bifodan A/S Bogbinderivej 6 3390 Hundested Tlf: 47 98 15 16 Fax: 47 98 15 17 E-mail: bifodan@bifodan.com www.bifodan.dk	Erik Brandsborg, Head of Quality and R&D	Bifodans virksomhedsfilosofi er, at udvikle og producere miljøvenlige bioteknologiske produkter til vedligeholdelse og forbedring af menneskers og dyrs helbred, velbefindende og livskvalitet. Kontraktproduktion og pakning af probiotika samt kosttilskud og farmaceutiske produkter. Kundespecifikke produkter.

Som supplement hertil følger nedenfor en liste over medicinalvirksomheder og kosttilskudsvirksomheder, som har eller har haft produkter med ginseng.

Virksomhed	Kontakt person	Kommentar
FERROSAN Sydmarken 4 2860 Søborg Tlf: 39 69 21 11 Fax: 39 69 65 19 E-mail: info@ferrosan.com www.ferrosan.dk		Ferrosan anvender en speciel “LipoCap” teknologi der kapsler og beskytter de active indholdsstoffer I produktet Metoden anvendes ved fremstilling af Zinaxin, et Ginger produkt
NATUR-DROGERIET A/S Nydamsvej 13-15 DK-8362 Hørning Tlf: 86 92 33 33 Fax: 86 92 33 43 E-mail: info@natur- drogeriet.dk www.natur-drogeriet.dk	Flemming Pedersen,	Forhandling af Ginseng G1000
DANSK DROGE Industrigrenen 10 2635 Ishøj Tlf: + 45 43 56 56 56 Fax: + 45 43 56 56 00 E-mail: dd@danskdroge.dk www.danskdroge.dk	Kirsten Milert, Beate Turner, Medical advisor Michael Møller Jensen, Sales director, international	GERIMAX ginseng i tablet form samt flydende form
Biosym Skolegade 49 DK-7430 Ikast E-mail: info@biosym.dk www.biosym.dk	Kim Nielsen	Dansk virksomhed. Specialiseret i udvikling og fremstilling af stærke vitamin- og mineralpræparater samt naturlægemidler og kosttilskud.
A/S ANJO Mariendalsvej 57 2000 Frederiksberg Tlf: 38 19 18 89 Fax: 38 33 33 45 E-mail: anjo@anjo.dk www.anjo.dk		Producerer og markedsfører naturlægemidler, kosttilskud gennem kliniske undersøgelser.

Mezina A/S Energivej 2-4 - DK-6700 Esbjerg Tlf: (+45) 75 18 16 11. Fax: (+45) 75 13 81 72 E-Mail: mail@mezina.dk www.mezina.dk	Lars Pedersen, Direktør	Udvikle, producerer og markedsfører dokumenterede naturlægemidler, kosttilskud og homøopatiske lægemidler af højest mulig kvalitet.
Wolles Nature System A/S Buesøvej 19, Kattinge 4000 Roskilde Tlf: 46 40 28 67 Fax: 46 40 21 12 E-mail: wolle@wolle.com www.wolle.com		Se virksomhedsprofil på hjemmeside

10. Ekstraktion – indholdsstoffblandinger

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. Den typiske ekstraktion af ginseng gennemføres med alkohol typisk i koncentrationer fra 30 til 70 %. Optimumskoncentration på 50 % alkohol i vand for ekstraktion dækker over små forskelle for neutrale og malonyl ginsenosider og er typisk 10-15 % mindre effektiv end 80 % methanol, der giver den mest effektive ekstraktion. Methanol er dog sundhedsfarligt og kræver total fjernelse efter ekstraktion. Forud for selve ekstraktionen bør materialet findeles ved f.eks. blendning for, at reducere tiden der går før ekstraktionen er færdig. Ekstraktion foretages hyppigst på tørrede pulveriserede rødder, men kan principielt uden problemer foretages på friske rødder.

Alkohol ekstrakter kan tørres ved spray tørring og australske undersøgelser har vist, at der kan tages op til 12-15 % ginsenosider ved tørringstemperaturer på mellem 100-180 °C, men at processen går ret hurtig og giver et pænt kremefarvet pulver. Dette kan benyttes som grundlag for bl.a. tabletfremstilling.

Det skal nævnes, at man i amerikansk ginseng også benytter vandige ekstrakter i forbindelse med undersøgelser af blodsukkersænkende egenskaber og mulig anti-diabetiske effekter.

Ekstraktion kan gøres både ved stuetemperatur, men gøres typisk ved højere temperaturer op til kogepunktet, hvilket forbedrer ekstraktionsraten væsentligt. Højere temperaturer medfører oftest en reduktion i malonyl ginsenosider.

Der afprøves i disse år forskellige metoder til, at forbedre ekstraktionen af ginseng, herunder f.eks. anvendelse af mikrobølger eller ultralyd under alkohol ekstraktion.

B. Der er umiddelbart 3 metoder til ekstraktion af rødder.

1. Batch proces ved brug af kar- ekstraktion med manuel håndtering.
2. Batch proces ved brug af kar- ekstraktion med div. variationer af automationsgrader.

Ved batch processen opnås kun et ligevægtstrin pr. håndtering.

3. Kontinuert proces ved brug af

Kop-elevator

Kop-karrusel

Div. karruseller

Alle 3 er ret komplicerede og dyre.

En fjerde mulighed for en kontinuert ekstraktions vil være ekstraktion i en mixer-transport snegl. (Se fig. 15.6.)

Det vil være muligt at låne/leje et sådant anlæg hos firmaet

Biosynergy A/S

Ved Martin Jørgensen.

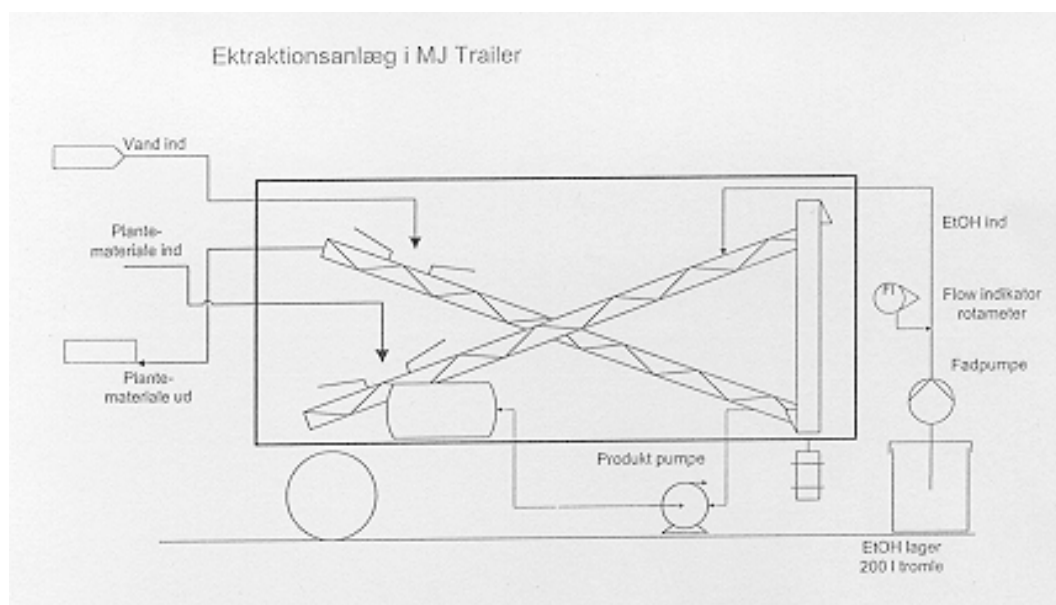


Fig. 15.6. Ekstraktionsanlæg i MJ Trailer

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces

Paramedical A/S Vassingerødvej 3-7 3540 Lyng Tlf: 48 18 93 44 Fax: 48 18 93 83 E-mail: info@paramedical.dk www.paramedical.dk	Karen Christensen, farmaceut	Fremstiller helseprodukter bl.a Longo Vital. Laver muligvis kontraktarbejde for andre.
Winther Medico A/S Højager 3-5 5270 Odense N Tlf: 66 18 91 91 Fax: 66 18 88 40 E-mail: info@winthermedico.com www.winthermedico.com	Bent Winther, Direktør	Udvikling og fremstilling af farmaceutiske produkter og helseprodukter herunder kosttilskud, vitamin- og mineralpræparater og urteekstrakter. Virksomheden udfører lønarbejde herunder ekstraktion samt færdigprodukter.
Biosynergi	Martin Jørgensen	Er i gang sammen med Ingeniørhøjskolen Odense teknikum med udvikling af et mobilt ekstraktionsanlæg, der kan minimere aktive stoffers forsvinden gennem ekstraktion i umiddelbar tilknytning til høst. Kan have betydning især for ginseng frugt (bær).

11. Special ekstraktion og oprensning/omdannelse til rene ekstrakter- stoffer (ginsenosider, polyacetylene, polysakkarider mv.)

- A. Anvendte processer - tekniske løsninger (stabilitet, stofgrupper, enkelt stoffer, enzymatisk conversion)
- B. Forbedrede/nye processer - tekniske løsninger - effektivitet og økonomi
- C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces
- D. Delkonklusion/strategiske udviklingsmuligheder

A. I fremtiden vil muligheden for, at oprense og isolere enkeltstoffer og muligvis modificere disse stoffer kemisk/enzymatisk blive vigtige for udvikling af nye definerede produkter og udviklingen af egentlig medicin.

B. Speciel ekstraktion kan deles op i to uafhængige typer.

1. Hvor der anvendes et andet opløsningsmiddel (ekstraktionsvæske) end vand eller ethylalkohol.
Da vand og ethylalkohol er de eneste opløsningsmidler mennesker kan tåle, vil der ved brug af andre opløsningsmidler være nødvendigt med en total fjernelse af opløsningsmidlet fra ekstrakten.

Af miljø-og økonomi hensyn vil det også være nødvendigt, at fjerne opløsningsmidlet fra remanensen (det uopløselige stof), samt regenerering af opløsningsmidlet.

Det er de samme processer og apparatur der vil blive anvendt som nævnt i 15.6.

2. Superkritisk ekstraktion

Superkritisk ekstraktion med kuldioxid Superkritisk ekstraktion. Med kuldioxid og entrainer f.eks. metanol eller propan.

Subkritisk ekstraktion med vand.

Fælles for disse ekstraktions processer er, at stort set alt kommercielt udstyr er til batch-processer og meget dyrt.

Solventfri mikrobølgeekstraktion.

Membranekstraktion der oftest kaldes membrandestillation.

Superkritisk ekstraktion med kuldioxid

Superkritisk ekstraktion med kuldioxid, er en ekstraktion hvor man anvender superkritisk kuldioxid som ekstraktionsmiddel. Superkritisk kuldioxid er betegnelsen for den almindelige gasart kuldioxid, hvor tryk og temperatur er så højt at gassen opnår nye karakteristika. Et typisk fasediagram har en udformning med linier der adskiller de tre faser (fast, flydende og gas) fra hinanden, afhængig af tryk og temperatur. Linien der adskiller gas fra væsken starter i trippelpunktet og buer opad. På et tidspunkt forsvinder denne linie i det der kaldes det kritiske punkt. Over det tryk og den temperatur som punktet repræsenterer er det ikke muligt, at tale om stoffet som en gas eller en væske, men man kalder det i stedet for et superkritisk fluid. Et fasediagram for kuldioxid kan ses på figur 15.7.

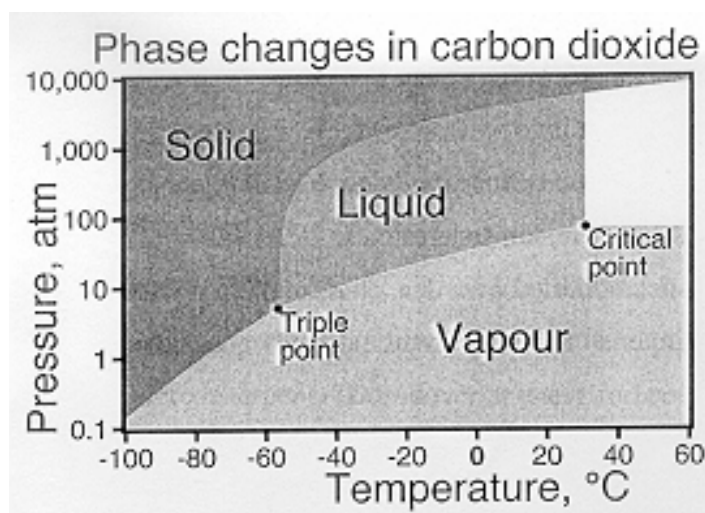


Fig.15.7. fasediagram for kuldioxid

Et superkritisk fluid har egenskaber af både en gas og en væske, og det er dette der gør at det er et godt opløsningsmiddel. De vigtigste egenskaber der påvirkes af, at gøre et stof superkritisk er dets densitet og viskositet. I området omkring det superkritiske punkt kan stoffets densitet nemt varieres, og derved påvirkes dets evne som opløsningsmiddel. Samtidig har et superkritisk fluid meget lavere viskositet end en væske, og det har derved nemmere ved at trænge ind i den matrix der ekstraheres fra. Ved at variere på tryk og

temperatur kan man derfor styre det superkritiske fluids evner som opløsningsmiddel, og opnå en effektiv ekstraktion samtidig med en nem adskillelse af ekstraheret stof og opløsningsmiddel efterfølgende.

Kuldioxids kritiske punkt ligger ved 31,1 °C og 72,8 atm, begge faktorer der er mulige at opnå uden større besvær. Samtidig har anvendelsen af kuldioxid som opløsningsmiddel den fordel, at det ikke på nogen måde er toksisk, og et produkt udvundet med det derved kan betragtes som sikkert, at indtage uden en kompliceret oprensning. Derudover er kuldioxid kemisk ureaktivt, og påvirker derfor ikke det ekstraherede produkt.

Flere grupper har undersøgt brugen af superkritisk kuldioxid som ekstraktionsmiddel i forbindelse medudvinding af æteriske olier. E. Reverchon og R. Taddeo har undersøgt forskellige parametres betydning for sammensætningen, at æterisk olie udvundet fra salvie. Den vigtigste faktor i deres undersøgelser er ekstraktionstiden, men også densiteten af det superkritiske kuldioxid har betydning. En vigtig ting de finder frem til er, at man skal holde sig til lavere densitet for, at undgå at man ekstraherer tungere komponenter med ud. Menak har undersøgt brugen af superkritisk kuldioxid som ekstraktionsmiddel på salvie, basilikum, oregano og løvstikke, samt hvilken effekt tryk og et eventuelt tilsætningsstof har. Som tilsætningsstof bruges ethanol, som er et hyppigt anvendt middel til, at forsøge at forbedre superkritisk kuldioxids ekstraktionsevne og selektivitet. Det konstateres, at begge faktorer har betydning for udbytte og sammensætning af den olie der udvindes.

Udstyr til superkritisk ekstraktion findes i mange forskellige størrelser. Nogle meget små enheder der udgør en del af analyseudstyr over små og store "pilot-plant" anlæg, til egentlige produktionsanlæg.

Superkritisk vand.

Det kritiske punkt for vand ligger højt, 374,2 °C og 217,6 atm og det er derfor ikke praktisk, at bruge vand som et superkritisk ekstraktionsmiddel. Det har dog vist sig, at det heller ikke er nødvendigt, at skulle op over det kritiske punkt før vand egner sig godt som ekstraktionsmiddel. Ved de temperaturer hvor man normalt arbejder med vand som væske, dvs. under 100 °C, er vand meget polært opløsningsmiddel, og det er derfor ikke specielt praktisk til ekstraktion af æteriske olier, der er apolære stoffer. Hvis man derimod hæver vands temperatur til over 100 °C, og samtidig hævertrykket så vand forbliver en væske, sker der det, at vandet bliver mindre polært og derved et bedre opløsningsmiddel. Ved at variere temperaturen, kan man styre vands polaritet, og derved dets evner som ekstraktionsmiddel.

Brugen af vand som ekstraktionsmiddel har også den fordel, at det ikke er toksisk samtidig med, at en efterfølgende adskillelse af olie fra vand ikke er vanskeligt, hvilket gør besværlige oprensninger unødvendige.

Solventfri mikrobølgeekstraktion

Denne metode er en nyere opfindelse, patenteret i 2003, der ikke anvender andet ekstraktionsmiddel, end det vand der findes i planten. Plantematerialet placeres i en kolbe, som herefter placeres i en modificeret mikrobølgeovn. Vandet inde i planten opvarmes via mikrobølger, hvilket får cellerne til at gå i stykker, hvorefter der frigives bl.a. æteriske olier. De æteriske olier fordampes derefter sammen med det frigivne vand. Uden for ovnen er placeret køling i form af en svale med køling på kappen således, at når vand og olie kondenserer på kappen, ledes det væk via et separat opsamlingsystem placeret på

ydersiden af kølingssystemet. Vandet vil lægge sig nederst og kan via yderligere en sidegren på opsamlingsystemet, ledes tilbage til kolben med plantemateriale. M.E. Lucchesi har afprøvet denne metode på basilikum, mynte og timian, og sammenlignet resultatet med olie opnået via vanddestillation. Konklusionen er, at metoden er væsentligt hurtigere end vanddestillation samtidig med, at den olie der produceres indeholder mere af de ønskede oxiderede terpen. Derudover er energiforbruget lavere.

Membrandestillation

Introduktion til membrandestillation

Membrandestillation (MD) er en af mange membran processer udviklet til opkoncentrering og adskillelse af stoffer. Princippet i MD bygger på en termisk dreven transport af damp over en porøs hydrofob membran.

En tidlig beskrivelse af membrandestillation stammer fra et U.S. patent af B.R. Bodell i 1963. På basis af dette patent tilføjes der i 1966 en beskrivelse af, hvorledes en opsætning bestående af silikonegummirørmembraner med en ydre diameter på 0,66 mm og en indre diameter på 0,30 mm virker. Disse membraner er damp, men ikke væske gennemtrængelige.

Findley publicerer i slutningen af 1960'erne den grundlæggende teori omkring direkte kontakt membrandestillation (DCMD). Her beskrives resultatet af, at have gas fanget i porerne i en hydrofob membran. Samtidig publiceres resultaterne af en række forsøg, hvor der er anvendt forskellige membranmaterialer, bl.a. gummi, papir, glasfibre, cellofan, nylon, m.v. Findley så nye muligheder i processen, bl.a. afsaltning af havvand.

Membrandestillation har i de senere år gennemgået en yderligere udvikling, ikke mindst fordi der er udviklet en række nye membranmaterialer med høj porøsitet og stor styrke. I dag anvendes der typisk porøse membraner fremstillet af polytetrafluorethylen (PTFE), polypropylen (PP) eller polyethylen (PE), med porestørrelser mellem 100 Å og 1 µm til MD processer. De mange publikationer inden for de sidste 5-10 år peger i retning af, at der er nye muligheder indenfor membrandestillation, bl.a. som en billigere og energibesparende alternativ til andre konventionelle membran processer, fx omvendt osmose (RO).

Samtidig er membrandestillation en langt mere skånsom proces, idet processen generelt gennemføres ved lave temperaturer og tryk. MD kan derfor med fordel anvendes indenfor fødevarerindustrien, bl.a. til opkoncentrering af frugtjuice og aromastoffer.

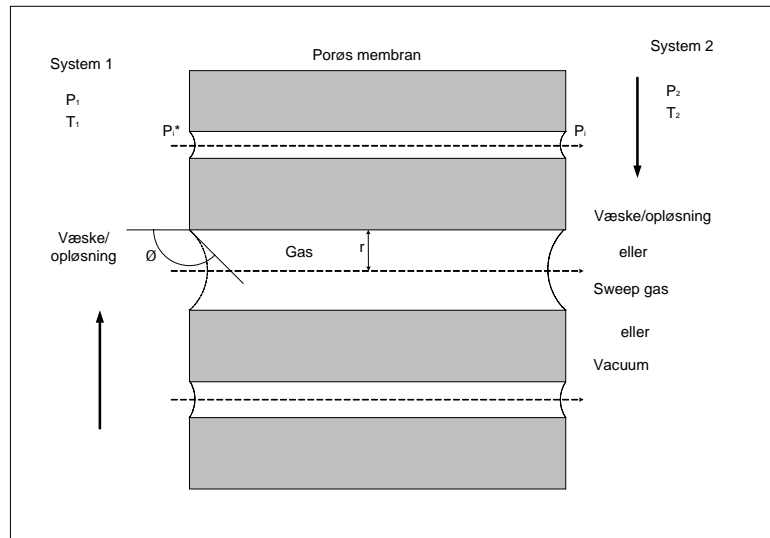
Membrandestillation sammenlignet med RO har dog stadig den svaghed, at den totale flux mængde ($\text{kg/m}^2 \cdot \text{h}$) generelt er lavere end for RO processer.

K.W. Lawson og D.R. Lloyd giver i deres publikation fra 1996 et udmærket historisk overblik og beskrivelse af de forskellige membrandestillationsprocesser. Artiklen beskriver anvendelsesområder for membrandestillation, membrantyper og materialer, samt den grundlæggende teori indenfor MD.

M. Khayet beskriver specifikt sweep-gas membrandestillation (SGMD) gennem eksperimentelle data og teoretiske studier. Artiklerne beskriver betydningen af relevante procesparametre, bl.a. væskeflow og væsketemperatur, samt gasflow og gastemperatur i forhold til permeatfluxen. Samtidig opstilles der modeller for varme- og massetransport for SGMD.

Principperne bag membrandestillation

Membrandestillation er en proces, hvor to væsker eller opløsninger med forskellig damptryk er adskilt af en porøs hydrofob membran, se figur 15.8. Membranens hydrofobe egenskaber forhindrer en direkte gennemtrængning af væske gennem membranens porestruktur. Membranen er kun gennemtrængelig for gasmolekyler. Herved vil en flygtig komponent kunne fordampe fra en varm væskeside, trænge igennem membranen og kondensere i en kold permeatstrøm.



Figur 15.8. Membrandestillation. En porøs hydrofob membran adskiller to væsker eller en væske og en gas.

Damptryksdifferensen er den drivende kraft ved membrandestillation. For en flygtig komponent vil der være en partialtrykforskel på fordampningssiden og permeatsiden, hvor gassen kondenserer. Dette betyder, at komponenten i fødestrømmen med det højeste partialtryk vil have den største flux over membranen.

Den drivende kraft over membranen påvirkes af en temperaturdifferens således, at der foregår en kontinuerlig masse- og varmetransport over membranen.

Da membrandestillationsprocessen er baseret på, at porerne indeholder en gasfase er det vigtigt, at porerne ikke gennemvædes af væske. For en porøs membran vil væske trænge ind i porerne hvis kontaktvinklen bliver mindre end 90° ($<90^\circ$) eller transmembrantrykket overstiger :

$$\Delta P = -\frac{2 \cdot \gamma_L}{r_{\text{pore}}} \cdot \cos \theta$$

Tilstedeværelse af overfladeaktive stoffer nedsætter i væsentlig grad overfladespændingen (værdien af $\gamma_L \cdot \cos$). Herved reduceres den trykforskel, der kan være over membranen, inden porerne fyldes med væske. For en typisk hydrofob membran er kontakt vinklen ca. 130° .

Faktorer der har indflydelse på væskegennemtrængning i porerne er: overfladeenergi i pore-materialet, overfladeaktive stoffer (γ_L), samt diameter på porerne (r_{pore}).

Af fordele ved membrandestillation kan nævnes:

- meget lille gennemtrængelighed for ioner, makromolekyler, pro- og eucaryote celler, kolloider, samt andre ikke flygtige stoffer.
- lav driftstemperatur, typisk ikke over 50-60°C.
- lavt drifttryk sammenlignet med andre trykdrevne membranprocesser.
- ingen kemisk interaktion mellem membran og væske.

Typiske anvendelsesmuligheder for membrandestillation er:

- afsaltning af havvand
- koncentration af vandige opløsninger
- opkoncentration af flygtige komponenter (ethanol, aromastoffer)
- fremstilling af ultra rent vand bla. til laboratorieformål

Der findes flere forskellige former for membrandestillation. Således kan membrandestillation opdeles i 5 hovedprincipper.

- | | |
|--------|------------------------------------|
| • SGMD | Sweeping gas membrandestillation |
| • VMD | Vacuum membrandestillation |
| • DCMD | Direct contact membrandestillation |
| • OMD | Osmotisk membrandestillation |
| • AGMD | Air gab membrandestillation |

For membrandestillation kan gasfasetransporten (fluxen) gennem membranen beskrives ved en generel transportligning.

$$J_i = \frac{\varepsilon}{\tau} \left(\frac{r_{\text{pore}}^2}{8 \cdot \eta} \cdot C_i \cdot \frac{dP}{dx} - \frac{1}{D_{\text{KN}_i} + \sum_{j=1}^n \frac{y_j - y_i}{D_{ij}}} \cdot \frac{J_{\text{jD}}}{J_{\text{iD}}} \cdot \frac{dC_i}{dx} \right)$$

Hvor ε er porøsiteten, τ er tortuøsiteten, og η er viskositeten. Ligningen vil ofte kunne simplificeres ved, at fjerne ledet idet trykforskellen over membranen ved MD er lille. For de enkelte membrandestillationsprocesser kan, der opstilles følgende grænsebetingelser til løsning af differentialligningen.

$$\text{Grænsebetingelser: } \left(\frac{r_{\text{pore}}^2}{8 \cdot \eta} \cdot C_i \cdot \frac{dP}{dx} \right)$$

Partialtryk for en komponent:

$$\begin{array}{ll} \text{SGMD:} & \begin{array}{l} x = 0 \quad \text{Molbrøk gasfase: } y_i = \gamma_{iI} \cdot \chi_{iI} \cdot P_{iI}^{\text{sat}} \\ x = L \quad y_i = y_i \end{array} \end{array}$$

$$P_{iI}^* = \gamma_{iI} \cdot \chi_{iI} \cdot P_i^{\text{sat}}(T_1)$$

$$P_{iI}^* = y_{iII} \cdot P_{iI}$$

$$\begin{array}{ll} \text{VMD:} & \begin{array}{l} x = 0 \quad \text{Molbrøk gasfase: } y_i = \frac{\gamma_{iI} \cdot \chi_{iI} \cdot P_{iI}^{\text{sat}}}{P_i} \\ x = L \quad y_i = y_i \text{ hvor } P_{iII} \approx 0 \end{array} \end{array}$$

$$P_{iI}^* = \gamma_{iI} \cdot \chi_{iI} \cdot P_i^{\text{sat}}(T_1)$$

$$P_{iI}^* = y_{iII} \cdot P_{iI} \approx 0$$

$$\begin{array}{ll} \text{DCMD:} & \begin{array}{l} x = 0 \quad \text{Molbrøk gasfase: } y_i = \frac{\gamma_{iI} \cdot \chi_{iI} \cdot P_{iI}^{\text{sat}}}{P_i} \\ x = L \quad y_i = \frac{y_i \cdot P_{iII}}{\gamma_{i,II} \cdot P_{i,II}^{\text{sat}}} \end{array} \end{array}$$

$$P_{i,I}^* = \gamma_{i,I} \cdot \chi_{iI} \cdot P_i^{\text{sat}}(T_1)$$

$$P_{iI}^* = \gamma_{i,II} \cdot \chi_{i,II} \cdot P_i^{\text{sat}}(T_2)$$

$$\begin{array}{ll} \text{OMD:} & \begin{array}{l} x = 0 \quad \text{Molbrøk gasfase: } y_i = \frac{\gamma_{iI} \cdot x_{iI} \cdot P_{iI}^{\text{sat}}}{P_i} \\ x = L \quad x_{i,II} = \frac{y_i \cdot P_{iII}}{\gamma_{i,II} \cdot P_{i,II}^{\text{sat}}} \end{array} \end{array}$$

$$P_{i,I}^* = \gamma_{i,I} \cdot \chi_{iI} \cdot P_i^{\text{sat}}(T_1)$$

$$P_{iI}^* = \gamma_{i,II} \cdot \chi_{i,II} \cdot P_i^{\text{sat}}(T_2)$$

Den maximale trykforskel over membranen er givet ved

$$\Delta P = P_1 - P_2 = -\frac{2 \cdot \gamma_L \cdot \cos \theta}{r_{\text{pore}}}$$

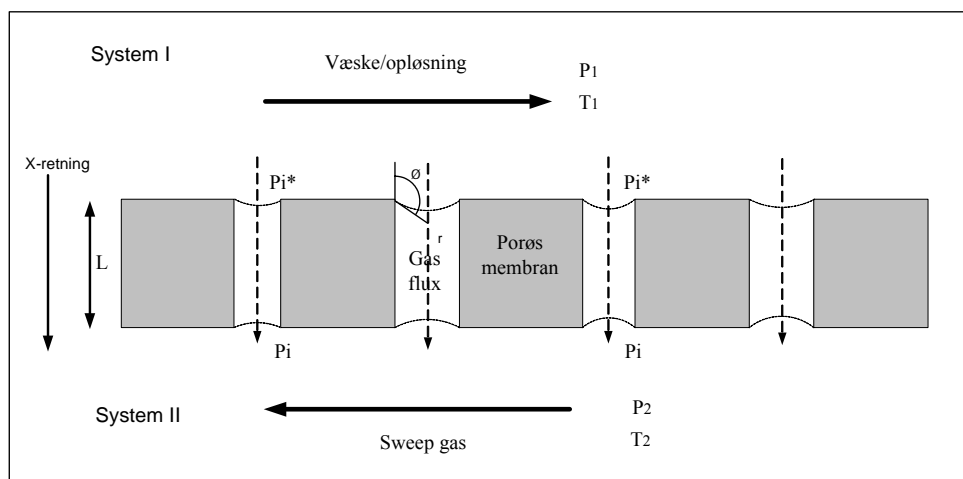
Trykforskellen over membranen ved membrandestillationsprocesser er normalt ikke over 1–1,5 bar da højere tryk vil øge risikoen for, at gennemvæde membranporerne.

I det følgende tekst vil principperne for de forskellige membranprocesser blive beskrevet, hvor hovedvægten vil blive lagt på SGMD.

Sweeping gas membrandestillation (SGMD)

Ved sweeping-gas membrandestillation er væske i direkte kontakt med den ene side af membranen og gas med den anden side af membranen, se figur 15.9. Sweep-gassen vil typisk være en inert gas f.eks. luft eller nitrogen. Den drivende kraft opstår ved forskellen i partialtryk. På grund af sweep-gassen vil damptrykket for en komponent være betydelig lavere på gassiden end på væskesiden. Væske (H₂O) samt andre flygtige komponenter i

fødestrømmen vil derfor fordampe på den varme side, og føres som gas over den porøse membran og derefter optages ved kontakt med sweep-gassen. Kondensationen af vand og øvrige komponenter sker ved nedkøling af sweep-gassen udenfor membranmodulet. For at øge den drivende kraft kan der påtvinges en temperaturforskel på væske- og gassiden. Herved vil temperaturgradienten over membranen yderligere resultere i en varmeoverførsel fra væskesiden til gassiden.



Figur 15.9. Princip i sweep-gas membrandestillation (SGMD).

Væskens temperatur har indflydelse på permeatfluxen over membranen [$\text{kg/m}^2 \cdot \text{h}$]. Højere væsketemperatur giver højere damptryk og dermed større drivende kraft.

C.H. Lee, beskriver ved forsøg med opkoncentrering af isopropanol ved hjælp af SGMD, at totalflux og selektivitet øges ved højere væskeflow. Dette kan tilskrives en reduceret koncentrations- og temperaturpolarisation på væskesiden, når væskeflowet øges.

M. Khayet konkluderer efter forsøg med SGMD på et kapillar modul, at væskeflow i området 0,1-1,3 m/s (laminar) ikke har en væsentlig indflydelse på fluxen.

Gassens temperatur er ikke afgørende for fluxen så længe temperaturdifferenten over membranen ikke er stor og dermed ikke i væsentlig grad påvirker damptryksgradienten. Khayet konkluderer, at gassens temperatur har ringe indflydelse på fluxen, men at moduldesign og membrangeometri kan have indflydelse på fluxen.

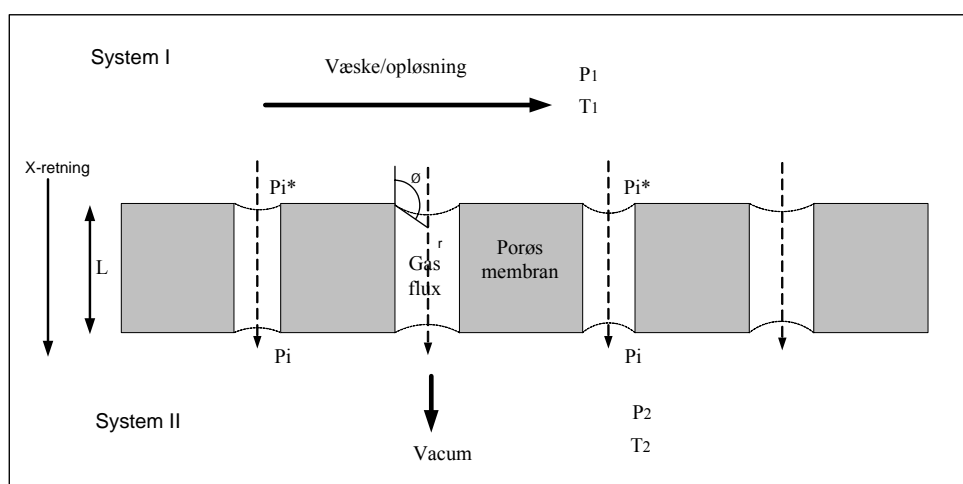
Gasflowet er en betydende parameter for fluxmængden. Et højt gasflow sikrer mulighed for optagelse af større mængder fordampede komponenter, og dermed større totalflux over membranen. M. Khayet konkluderer ud fra eksperimentelle forsøg på et flat-sheet modul, at gasflowet har afgørende betydning for fluxen. Dette forklares med, at et øget gasflow reducerer temperaturpolarisationen på membranoverfladen, samt at mætning af gassen ikke indtræffer.

Sweeping-gas membrandestillation kan med fordel anvendes til fjernelse af let flygtige komponenter fra en væskefase. Samtidig har SGMD den fordel, at driftstemperaturen er forholdsvis lav, hvilket medfører at stoffer så som aromastoffer, farvestoffer og antioxidanter ikke nedbrydes så hurtigt. SGMD har en begrænsning i den totale vandfluxmængde over membranen, og er derfor ikke velegnet til en egentlig opkoncentrering af væskeopløsninger.

Til SGMD benyttes typisk membraner fremstillet af PTFE eller PE. Normalt er membranmodulerne opbygget, som kapillarrørs- eller flat-sheet moduler. Generelt kan SGMD sammenlignes med stripning.

Vacuum membrandestillation (VMD)

Ved vacuummembrandestillation har væskestrømmen direkte kontakt med den hydrofobe membran, medens der på den anden side holdes et lavere tryk i form af vacuum, se figur 15.10. Vacuumtrykket findes typisk i området ned til 5 mmHg. Ved vacuummembrandestillation optræder membranen, som support for væske-damp ligevægten. Membranen kan have en vis selektivitet afhængig af porestørrelse og materiale. Ved små porestørrelser vil det være Knudsendiffusion der dominerer. Varmetabet over membranen er minimal ved VMD, idet der ikke sker nogen kondensation umiddelbart efter gastransport over membranen.



Figur 15.10. Princip i vacuummembrandestillation (VMD).

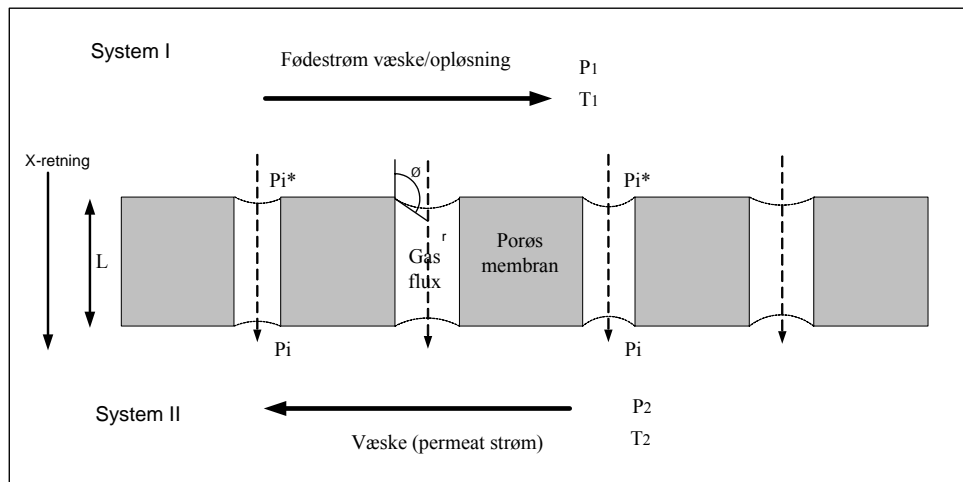
Vacuummembrandestillation kan anvendes til, at fjerne flygtige komponenter fra en væske. Dette kunne være fjernelse af benzen eller ethanol fra vand. Der ligger dog nogle begrænsninger ved VMD, idet der kan være større risiko for væskegennemtrængning sammenlignet med andre MD processer. Det er derfor vigtigt, at kontrollere trykforskellen over membranen set i forhold til typen og koncentrationen af flygtige stoffer i fødeblandingen. Ved VMD er det muligt, at have lavere temperatur på fødeblandingen end ved SGMD og stadig opnå en højere flux.

B. Jørgensen beskriver anvendelse af VMD til opkoncentrering af aromastoffer i solbærsaft. De eksperimentielle data viser, at en opkoncentreringsfaktor på 21-31 er mulig for flere aromastofkomponenter. Det konkluderes, at VMD er en lovende proces til en skånsom stripning af aromastoffer i varmesensitive frugtjuiceblandinger.

Direct contact membrandestillation (DCMD)

Når partialtryksdifferencen over membranen fremkommer ved, at en varm væske løber på fødestrømsiden og en kold væske på permeatsiden, kaldes processen - direkte kontakt membrandestillation (DCMD), se figur 15.11. Processen er den mest anvendte indenfor membrandestillation.

Porerne vil være fyldt med en inert gas med en meget lille strømningshastighed ($J_{i,\text{inert}} = 0$), herved vil fluxen for de øvrige komponenter over membranen kunne beskrives ved $J_i = y_i \cdot J_{\text{total}}$. Det er vigtigt, at der er luft/gas i porerne inden opstart.



Figur 15.11. Illustration af princippet i direkte kontakt membranderstillation (DCMD).

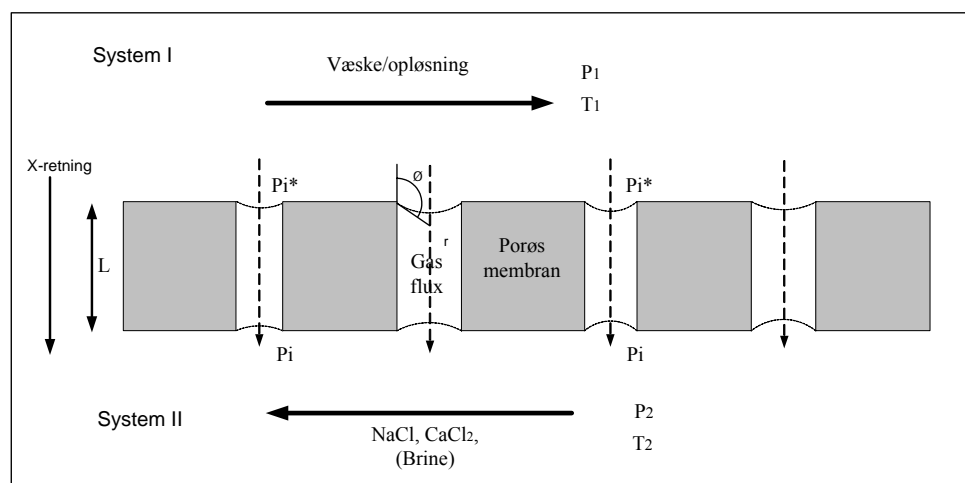
Der anvendes typisk membraner fremstillet af PTFE eller PE. Modulerne er opbygget, som kapillarrør eller flat-sheet membraner.

For at modvirke en temperaturpolarisation på membranoverfladen vil strømningshastigheden ofte være høj eller modulet kan være opbygget, så der er tværstrømning over membranen.

DCMD er især anvendelig, hvor der ønskes en opkoncentrering af fødestrømmen, eller eksempelvis til fremstilling af rent vand. Fluxen over membranen er hovedsagelig rent vand. Dette betyder også, at varmetransporten over membranen vil være forholdsvis høj sammenlignet med andre MD processer. DCMD er den membranderstillations proces, hvor der kan opnås den højeste flux over membranen. Værdier helt op på $75 \text{ kg/m}^2 \cdot \text{h}$ er målt, hvilket er sammenligneligt med fluxen ved omvendt osmose processer (RO). DCMD har også fundet anvendelse til rensning/opkoncentrering af kemikalier og spildevand, som fx spildevand fra tekstilindustrien [1].

Osmotisk membranderstillation (OMD)

Osmotisk membranderstillation fungerer i princippet som DCMD. Begge væsker løber med direkte kontakt til membranoverfladen. Ved OMD ændres der på aktivitetskoefficienten (γ) i permeatstrømmen ved, at tilsætte fx NaCl eller CaCl_2 . Denne brine giver et lavere damptryk på permeatsiden og dermed en drivende kraft for de flygtige komponenter, se figur 15.12. Således vil processen kunne forløbe uden, at der nødvendigvis skal være en temperaturforskel på føde- og permeatstrømmen.



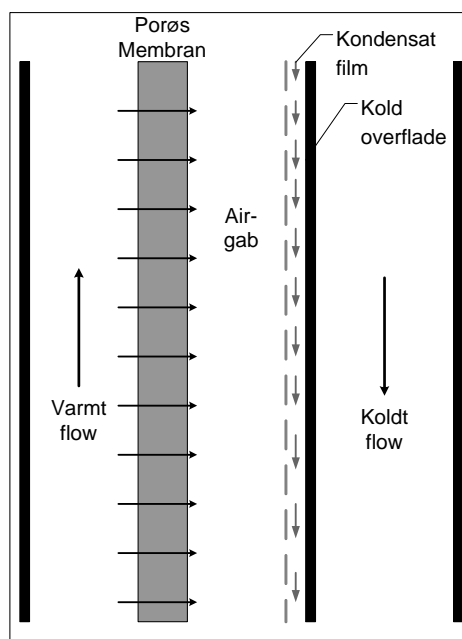
Figur 15.12. Princip ved osmotisk membrandestillation (OMD).

Porerne i membranen vil under processen være fyldt med en inert gas typisk luft eller nitrogen. For den inerte gas vil fluxen være nul. $J_{i, \text{inert}} = 0$, for de øvrige komponenter der transporteres over membranen kan fluxen beskrives ved $J_i = y_i \cdot J_{\text{tot}}$

Air-gab membrandestillation (AGMD)

AGMD er ikke så anvendt som de øvrige MD processer. Dette skyldes bla. en mere kompliceret opbygning. AGMD modulet består af et kondenserrør, hvori der løber en kold væskestrøm. Væggene i kondenserrøret er uigennemtrængelige og er typisk fremstillet af metal. Den opvarmede fødestrøm sendes igennem et fordamperrør, hvor væggene består af en porøs membran. De to rør er adskilt, og imellem dem er der luft. Herved fremkommer navnet air-gab, se figur 15.13. Temperaturforskellen mellem rørene frembringer en damptryksforskel.

Herved diffunderer gassen gennem den porøse membran og videre til den kolde kondensat overflade. Processen frembringer samtidig en varmetransport over membranen.



Figur 15.13. Princip ved Air-gab membrandestillation (AGMD).

AGDM har med succes været anvendt til fremstilling af rent drikkevand. Den totale flux-mængde ved en sådan proces vil være op til maksimalt $75 \text{ kg/m}^2 \cdot \text{h}$. Uriot har beskrevet, hvorledes AGMD kan anvendes til bryde en azeotropblanding af vand og saltsyre eller propionsyre. Princippet bygger på, at der er forskel i diffusionshastigheden på syre-luft og vand-luft i luftrummet (air-gab). Ved AGMD er varmetransporten over membranen mindre sammenlignet med DCMD pga. af konstruktionen med et air-gab.

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces.

Der er ikke kendte danske firmaer, der foretager dette på ginseng. Danske virksomheder der anvender et standardiseret ekstrakt af ginseng køber dette på det internationale marked. Det standardiserede ekstrakt, der købes bliver analyseret for aktive stoffer.

Ekstrakten indgår herefter i virksomhedens formuleringer, der enten er tabletter eller flydende produkter (se virksomheder under pkt. 9).

Det vurderes, at der muligvis findes lignende udstyr/apparatur til disse processer i bl.a. fødevarerindustrien i Danmark, men at det nok vil være vanskeligt, at udvikle dette for dansk produceret ginseng.

D. Potentialer på specialekstraktionsområdet ligger på udvikling og tilpasning af apparatur til det udenlandske marked, her især det asiatiske og nordamerikanske ginsengmarked.

Denne udvikling vil gå hånd i hånd med behovet for enklere, billigere og renere oprensning, samt behovet for yderligere oprensning i rene stoffer. Det kan dog anføres at kommende ny dansk viden om enkeltstoffers effektivitet fulgt op med dansk udvikling og patentering af specialekstraktionsudstyr eller teknikker vil kunne betyde konkurrencemæssige muligheder for en dansk udnyttelse.

12. Formuleringer – hjælpestoffer og kombinationsprodukter

Se under kapsel og tablet fremstilling: her henvises til firmaer indenfor området.

13. Standardisering og proces kontrol

C. Danske firmaer med tekniske løsninger på denne proces.

TCM Denmark kan bistå med rådgivning på Standardisering og godkendelse til levnedsmiddel og medicinalproduktion.

TCM Denmark Forskerparken 10 C DK 5230 Odense M tlf. +45 70 211 850	Bjørn Petersen direktør	Ekspertise i levnedsmiddel og medicinalproduktion
--	----------------------------	--

Ginseng bær – høst og forarbejdning (delprojekt 15 fortsat)

A. Generel beskrivelse

I langt den overvejende del af ginseng produktionen i verden høstes bærrene alene med det formål, at sikre frø til næste produktionscyklus. Selve bærret og evt. saftkomponenter af dette anvendes dermed ikke, men bliver kasseret i processen med oprensning af frøet. I meget begrænset målestok findes specialproduktioner af tørrede bær, saft eller juice produkter, som oftest sælges direkte fra producenten/ginsengavleren eller i specialbutikker.

Her gennemgås først standard metoder vedr. høst og frørensning og dernæst mulige procesmetoder, der vil kunne tillade udnyttelsen af bær og saftdelen af ginseng bær i fremtiden udover, at sikre frøet som ressource.

Amerikansk og koreansk ginseng ligner vækstmæssigt hinanden så meget at de praktiske høstmetoder og bærprocessering vurderes, at kunne være de samme. Denne gennemgang er primært baseret på viden om amerikansk ginseng fra litteratur og fra egne erfaringer.

Se også tidligere delprojekt omkring bærhøst, ekstraktion mv.

Høst af ginseng bær.

Amerikansk ginseng blomstrer og frugtificerer først af betydning i år 3, mens nær maksimal bærudbytte først opnås i det 4. år. Ældre planter vil oftest fortsætte med, at give bær i god mængde, men udbyttet pr areal vil ofte blive presset nedad af et faldende antal planter/areal med øget alder i dyrkede bede. Dette er primært forårsaget af øget sygdomstryk med øget alder. Omvendt ses ofte et højere antal planter med flere skud og dermed flere blomsterstande i ældre planter. Der er ingen dokumentation af eller erfaringsviden publiceret vedr. længerevarende bær/frøavl i ginsengplantager, men det er kendt at nogle plantninger kan give betydeligt flere bær og frø end andre, hvilket har givet anledning til en lokal og tidsmæssigt afgrænset specialisering i bærproduktion til frø.

Placering af blomsterstand og bær i afdækkningen

Der kan være op til ca. 50 blomster i en skærm, men ikke sjældent er der et noget mindre antal. Skærmfacon og antal bær pr stand er genetisk bestemt og der kan være stor variation mellem enkeltplanter i den samme population. Selvom alle blomster og bær i princippet kan danne 5 frø, dannes der dog primært bær med 2-3 frø pr bær og i mindre omfang bær med 1 eller sjældent 4 og 5 bær.

Blomster og bær sidder i halv- eller helskærme på korte 1-3 cm lange småstilke, som stråler ud fra toppen af den basale blomsterstilk. Denne basis blomster stilk varierer meget i længde fra plante til plante (fra få cm længde til måske 15-18 cm længde). Dette gør, at blomster og bær hos nogle planter sidder næsten skjult mellem ginsengplantens blade, mens de hos andre planter sidder frit og oprette over bladene. Mekanisering af høst ville være relativt nemmere hvis alle planter havde lange blomsterstilke, der sad frit over løvet og alle planter havde nogenlunde sammen stilkhøjde. Da der ikke er foretaget en selektion for et mere ensartet udseende af ginsengplanter, er det for nuværende ganske vanskeligt at mekanisere høsten af ginseng bær, uden samtidig at beskadige løv og stilke betydeligt. Hertil kommer problemer ved separering af en evt. blandet bær og løvmasse efterfølgende, samt den negative effekt på rodmasse og kvalitet, herunder evt. problemer med overvintring og sygdomsmodtagelighed.

Bærmodning

Blomstring sker først i de yderste/nederste dele af blomsterstanden, og bærmogningsforløbet svarer til dette. Undersøgelser fra Nordamerika har vist, at ginseng bær i en skærm typisk modner over en ca. 3 ugers periode, fra første til sidste bær er modent. Bærret skifter fra grøn farve og fast struktur over lillagrøn til dybrød farve og blød bærtæktur. Ved fuldmodenhed øges saftandelen i bærret betydeligt og frugtskindet begynder, at revne og henfalde. I denne fase er bærrerne meget modtagelige for angreb af gråskimmel og potentielt andre svampe, der går på frugter. Hos de fleste planter falder bærrerne af småstilkene ved modenhed, mens de hos nogle planter kan blive siddende i længere tid eller falder af samlet ved, at basisblomsterstilken knækker af ved mekanisk påvirkning, eks. vind. Den store variation i hvor fast bærrerne sidder og hvordan de spredes gør det yderligere vanskeligt, at mekanisere høsten. Rystning af bærrer sikrer ikke, at alle bær høstes. Evt. sprøjtning med ethylen mhp. dannelse af løsningslag i bærrer nogle dage før høst kunne være en undersøgelse værd. Canadiske undersøgelser har vist, at ethylen sprøjtning kan bevirke blomsterfald i juni måned således, at blomstring og bærsætning kan undgås i år 3 og 4, hvorved et øget udbytte på 30-50 % af rødder kan opnås.

Manuel høst af bær

Den almindeligste metode til, at høste ginsengbær er stadig håndplukning, selvom der er foretaget forsøg med mekanisk høst i BC Canada. Der plukkes typisk af to gange med 1,5-2 ugers interval hvorved næsten alle bær kan høstes i fuldmoden tilstand, hvilket sikrer bedste frøkvalitet og spiring. Det er dog oftest mere økonomisk, at høste en gang og lade bærrerne modne godt, og herunder acceptere et lille tab af bær der falder af for tidligt. En nordamerikansk arbejder kan typisk plukke over 50 kg bær pr dag. Typiske tal for skønnede arbejdstimer til høst af ginseng bær, andrager godt 100 timer pr ha i år 3 og godt 200 timer pr ha i år 4. Der regnes med høst af godt 400 kg frø pr ha i år 4. (BC prod guide)

Forholdet mellem frugtvægt og frøvægt er ca. 4,5 til 1, dvs. 400 kg frø svarer til ca. 1800 kg frugt.

Det kan overvejes om en maskinel høst (afklipping og opsamling) af de bærrer, der sidder over bladmassen kan gennemføres for, at reducere antal timers efterfølgende høstbehov af bærrer 'nede i afgrøden'. En manuel bærrer kan dog samtidig sortere eller fravælge dårlige frugter, mens en maskine tager alt med. Kvaliteten kan derfor godt blive påvirket ved maskinel høst. Der er ikke fundet beskrivelser af maskinhøst teknikker.

Bærkvalitet – mikrobiologisk kontaminering og stabilitet

Da bær i plantager naturligt kan være inficeret med en række plantepatogene organismer (svampe og bakterier), der dels kan give forringet bærrerstrakt kvalitet og dels give toksikologiske og holdbarhedsmæssige problemer i et produkt er det afgørende, at den bærrermængde, der plukkes og anvendes repræsenterer sunde og veludviklede bær uden synlige angrebs symptomer. Bær kan skylles i vand for, at fjerne de værste urenheder mv. og det er i såfald afgørende, at vandet der anvendes er sundhedsmæssigt rent. En pasteurisering af bærrerne kan komme på tale for, at sikre et mikrobiologisk stabilt produkt efterfølgende i processen.

Dampning, eller blanchering af bær i kogende vand i kort tid kan overvejes for, at fjerne ydre patogener. Det bør dog tjekkes, at disse metoder ikke nedbryder de evt. aktive stoffer som bærrene indeholder. Såfremt bærproduktet tørres eller fryses hurtigt eller der foretages en kemisk ekstraktion, der dræber evt. patogener, er denne råvarepasteurisering måske ikke nødvendig.

Fjernelse af frugt for at opnå rent frø

Fjernelse af frugtkødet gøres oftest ved, at lade bær gå mere eller mindre i opløsning i få dage til en uge før frøet vaskes ud på sold ved at spule vand på massen. Denne eftermodning af bær skal ske forsigtigt for ikke at skade frøet, dvs. bærrene lægges f.eks. i tyndt lag (ca. 5-8 cm) på cement gulv, i netsække eller i kasser med plast eller metalnet i bunden så, der sikres dræn og iltadgang og gæring af massen undgås. Der skovles/blandes rundt 1-2 gange om dagen for, at sikre jævn blanding og tilstrækkelig ilttilførsel. Massen holdes fugtig og saften skal drænes væk så frøet ikke skades. Bærrene må ikke lugte gærede, så vil frøet have risiko for at være skadet.

Jo mere opløste/nedbrudte bærrene er, jo nemmere er det at rense frøet helt rent for frugtkødsrester. Netop frugtrester på frøet er vækstpunkt for svampe under den efterfølgende frøbehandling og bør så vidt muligt undgås.

Når bærrene er godt nedbrudte kan bærmassen enten lægges på et plant soldnet, hvor frugtkødsrester kan spules igennem med vand, men hvor frøet bliver liggene på nettet. Frugtmassen kan også placeres i en roterende metal nettromle, en såkaldt frøvasker, hvor massen roteres med løbende tilførsel af vand. Frugten slås hurtigere i stykker ved rotationen (vinger der maser bærrene mod siderne) og skylles ud af nettromlen med vandet. Da frøet af ginseng har et hårdt ydre der tåler en del mekanisk belastning uden, at skades er det muligt, at foretage en ret hård mekanisk bearbejdning af bærmassen forud for skylning med vand. I laboratorium format har det ved DJF AHP været almindeligt, at blende bær med lidt ekstra vand ved lav hastighed i f.eks. 20-30 sekunder, hvorefter alt frugtkød er slået af frøet. Denne teknik vil gøre det nemmere, at rense frugtkød af frø selv uden en eftermodning/nedbrydningsperiode, dvs. på frisk høstet bær. Hastigheden skal afpasses således, at frøet ikke slås i stykker, men at frugtrester effektivt fjernes fra frøet. Denne teknik minder om den 'maceration' (eng.) der foregår i en slagmølle til fjernelse af bl.a. kirsebær frugt fra kirsebær sten i frørensning hos frøfirmaer.

Blendningsteknikken er af stor interesse, da den potentielt vil tillade at adskille frugt og frø af nyhøstede bær af høj kvalitet i to anvendelige fraktioner; dels frø til videre planteproduktion, dels frugtekstrakt til videre anvendelse i farmaceutiske/plantemedicinske /novelfood produkter. Sidstnævnte råvare er blevet meget mere interessant efter offentliggørelsen af forskning der tyder på, at ginseng frugten udover en blodsukkerstabiliserende effekt også har separat vægttabs egenskaber hos diabetiske mus. En mulig anvendelse af ginseng bær vil øge indtægterne i den eksisterende ginseng produktion og dermed forbedre rentabiliteten.

De ovenstående frugter/frøseparationsteknikker gennemføres typisk som batch processer, selvom slagmølle princippet kan køre, som kontinuert fødet proces.

Der regnes med ca. 10 timer/ha til, at rense høstet frø i år 3 og 20 timer i år 4. (BC-MAFF)

Overvejelser af fremtidige metoder til separering af bær og frø

Ved DJF-AHP er der i projektets regi fremstillet ekstrakter af bær på forskellige måder mhp. at teste disse ekstrakter dels for indhold af ginsenosider og polyacetylenier og dels for aktivitet i diabetes bioassay. I disse tests er det afgørende, at frøkomponenten er skilt fra bærrerne før ekstraktion for aktivstoffer påbegyndes, da det ellers er uklart om stofferne findes i frø eller frugtkomponenten.

Derudover har det været af interesse, at undersøge hvor evt. aktivstoffer primært findes i bærret, i bærskindet, i bærsaften eller i frugtkødet (pulpen). Der er derfor fremstillet 4 typer ekstrakter ved følgende processer:

1. Hele bær-ekstrakt.

Hele modne bær placeres i blender med kendt mængde ekstra vand tilført (volumen vand så bærrerne lige er dækket i blender) og derefter blendet ved laveste hastighed (laveste af 7 hastigheder) i 20-30 sekunder. Herved frigøres frø og frugt fra hinanden, i en let tyktflydende vandig masse. Denne sigtes igennem plast sigte med hulstørrelse ca. 2 x 2 mm. Frøet tilbageholdes mens bærmassen overvejende falder igennem sigten selv. En mindre mængde skum og lidt frugtkødsrester bliver hængende på sigten og frøet, og skal enten skyldes igennem med lidt ekstra vand (evt. spray for minimalt vandtilførsel)) eller slynges igennem sigten (f.eks. ved centrifugering) for, at få 100 % udbytte. Tabet ved ikke, at få den sidste rest med vurderes, at være under 1 % vægtbaseret af den totalt udvundne frugtmasse. Processen efterlader en let fortyndet og findelt, vandig, rødlig bærekstrakt og en rensset frømængde, der er uskadt. Denne proces bør kunne gennemføres teknisk i storskala som kontinuert fødet proces. Finoprensning af dette produkt kunne gøres effektivt ved membranseparationsteknikker/centrifugeringsteknikker mv.. Et apparatur i 'farmsize' (1-50 ha) kunne have afsætningspotentiale i såvel Nordamerika og i Kina, Korea og Japan.

2. Bær- presse saft.

Hele modne bær placeres i trykpresse, og der trykkes en ren pressesaft ud af bærrerne uden en forudgående ødelæggelse af bærrerne. Princippet svarer til en æblepresse.

Processen efterlader en ren klar pressesaft uden farve (kun frugtskind indeholder rød farve), samt en pressekage med frø, der efterfølgende ekstraheres med vand som i metode 1.

1. Det forudsættes at ren pressesaft har en højere værdi end en vandig ekstrakt som i metode 1.

Processen er i laboratoriet kørt som batch proces, men vil kunne udvikles til kontinuert presse proces uden problemer. Processen kan evt. kombineres med membranseparation/centrifugering for, at maksimere udbyttet. Da vandindholdet i modne bær inkl. frø er på omkring 80 % vil der være en del saft at trække ud.

3. Bærskinds fraktion.

Denne fraktion er speciel og kræver lidt ekstra håndtering. Bærskindet er ret tyndt og går let i stykker og er i frisk tilstand vanskelig, at separere fra restpulpen og frøet. I laboratoriet er frugtskindet fjernet manuelt med pincetter mv. hvilket er ekstremt tidskrævende.

Såfremt bærrerne fryses (-20°C uden, at fryse sammen til en klump) og udsættes for en ekstern hurtig og kortvarigt tøprocess (evt. dyppe i varmt vand i få sekunder) vil man kunne få et bær hvis indre er bundfrosset og hårdt mens den yderste mm af bærret, her

bærskindet, vil være optøet og sandsynligvis let et gnide af bærret ved roterende mekaniske bevægelser i kort tid. Kombineres med en 'flushing' med kraftig vandstrøm eller en kraftig luftstrøm under denne proces, bør man kunne blæse det løsede bærskind af og ned igennem et sold mens det frosne bær vil blive liggende. Processen kræver fin-tuning og hurtige delprocesser for at lykkes, men bør kunne give et produkt med relativ høj bærskindindhold i forhold til metode 1. Frysning af opfugtede frø til under -5°C vil normalt dræbe frøet, hvorved en værdifuld ressource mistes.

4. Rest frugtpulp fraktion

De hele modne bær fra fraktion 3, der har fået fjernet bærskindet, kan efterfølgende presses i bærpresse for, at fjerne pressesaft og dermed kun efterlade den rene frugtpulp, som kan separeres fra frøet med tilførsel af vand, som i metode 1. Alternativt kan hele pulpen med saft separeres efter metode 1.

For at fraktionering 3 og 4 er interessant kræves, at bærskind eller pulpfraktionen indeholder særlige stoffer, som er interessante at adskille fra resten, og at det er økonomisk mere interessant end en opkoncentrering ud fra et total bærekstrakt.

Ovenstående separeringer og ekstrakter af friske bær kan efterfølgende udsættes for yderligere oprensning, homogenisering, pasturisering, ekstraktion, tørring mv.

5. Tørre bærfraktioner

Udover ovenstående fraktioner kan man evt. forestille sig et produkt baseret på tørring af hele bær eller af pressekagen fra metode 2 alene.

En tørring i plantørrier eller tromletørrier ved op til 40°C med god ventilation vil måske give en skrøbelig bæroverflade, der sandsynligvis delvis vil blive slidt af frøet ved mekanisk påvirkning i tromle el lign. Løsnes bærrester ikke helt kan det overvejes, at fryse bærrester i flydende kvælstof i kort tid fulgt af en mekanisk påvirkning igen i frosset tilstand. Frøet vil normalt overleve denne behandling når det er helt tørt, mens bærfraktionen vil blive endnu mere skrøbelig og derfor nemmere adskilles fra frøet. Hvis frøet sigtes fra vil den tørrede bærfraktion udgøre et findelt råpulver, der kan bearbejdes yderligere.

Det vurderes, at vandig ekstraktion af bærulp og efterfølgende tørring vil give noget større udbytte og et renere produkt.

B. Overvejelser af fremtidige metoder til separation af bær og frø.

Ved opvarmning og især frysning er anlægs- og driftsomkostninger meget høje, så hvis Separationen kan klares ren mekanisk vil dette være at foretrække.

En anden mulighed kunne måske være en enzymatisk forbehandling med nogle af de enzymer man anvender til klaring af juice eller til forøget ekstraktion af bær masse.

Vedr. Centrifuger.

Centrifuger anvendes ved 3 typer separationsprocesser.

- Filtrering
- Væske-væske ekstraktion
- Adskillelse af faststof (partikler o.l.) fra væske, men bør kun anvendes, hvis faldhastigheden er så langsom, at en almindelig tykner ikke kan anvendes.

C. Frugt og bær – saft industrien/mostfabrikker samt levnedsmiddelindustrien har udstyr der vil kunne tilgodese de fleste af de almindelige processer. Herudover har flere danske træfrøhandlere tromlefrøvaskere og slagmøller, som måske kan lejes på timebasis eller arbejdet udføres om lønarbejde i forbindelse med frøekstraktion.

D. Såfremt yderligere forskning på bær viser, at der er et lovende marked for bærbaserede produkter, vil der blive behov for yderligere udvikling og raffinering af produkter, herunder optimering af dyrkningen. Den store interesse i disse år tyder på, at der vil foregå en vis udvikling på området under alle omstændigheder.

Litteratur

Anonym, 1998 Ginseng Production guide for commercial growers. (1998 edition). British Columbia, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Associated Ginseng growers of British Columbia.

Anonym, 2000 Planning for profit. Ginseng – Southern Interior, Spring 2000. Ministry of Agriculture, Food and Fisheries, British Columbia. 1-4. BC-MAFF hjemmeside.

Davidson, V.J., Li, X. and Brown R.B. 2004 Forced-air drying of ginseng root: 1. Effects of air temperature on quality. Journal of food engineering. Vol 63 (4), 361-367.

Davis, J. 2000 Ginseng: a production guide for North Carolina. North Carolina State University. Raleigh, NC: <http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/hil/pdf/ag-323.pdf>

Hsu, S. 1986 Processing methods for ginseng and characteristics of processed ginseng. Bulletin of Chinese Materia Media, 11(10), 602-603.

Hu, W., Tanaka, S., Uchino, T. and Nei, D. 2004 Storage life extension of ginseng using active modified atmosphere packaging by nitrogen generator. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 49(2), 401-408.

Hu, W., Tanaka, S., Uchino, T., Hamanaka, D. and Hori, Y. 2004 Effects of packaging film and storage temperature on the quality of fresh ginseng packaged in modified atmosphere. J. Fac. Agr. Kyushi Univ., 49(1), 139-147.

Jackson, C.C., Rupasinghe, V., Schooley, J., Ayanbadejo, T. and Martos, P. 2004 Assessment of Ontario-grown ginseng (*Panax quinquefolius* L.) for nutritional quality and food safety. Proc. XXVI IHC – Future for medicinal and aromatic plants. Eds. L.E. Cracker et al. Acta Horticultura, 629, ISHS 2004.

Jing, H., QuanCheng, C., Xiaojie, G., Yinan, Z. and Wenxiu, L. 2003 Effect of different methods on extracting ratios of ginsenosides. Journal of Jilin Agricultural University, 25(1), 71-73. (Abstract).

- Kimj, M.H., Kim, S.M. , Kim, C.S., Park, S.J., Lee, C.H. and Rhee, J.Y. 2002. Quality of Korean ginseng dried by a prototype continuous flow dryer using infrared radiation and hot air. Canadian biosystems engineering.44:3, 3.47-3.54.
- Li, T.S.C. 1995 Asian and American ginseng – a review. HortTechnology, 6(1), 27-34.
- Park, I.H., Piao, L.Z., Kwon, S.W., Lee, Y.L., Cho, S.Y., Park, M.K., and Park, J.H. 2002 Cytotoxic dammarane glycosides from processed ginseng. Chem. Pharm. Bull., 50(4), 538-540.
- S.Y., Park, Cho, S.Y., Park, I.H., Lee, Y.L., Park, M.K. and Park, J.H 2002 Method of processing ginseng and processed ginseng obtained by the same. US Patent No. US 6,753,018 B2, 22 Juni 2004.
- Ren, G. and Chen, F. 1999 Degradation of ginsenosides in American ginseng (*Panax quinquefolium*) extracts during microwave and conventional heating. J.Agric.food Chem., 47, 1501-1505.
- Reynolds, L.B. 1998 Effects of drying on chemical and physical characteristics of American ginseng (***Panax quinquefolius*** L.) Journal oof Herbs, Spices & Medicinal Plants, vol 6(2), 9-21.
- Small, E. and Catling P.M. 1999 Canadian medicinal crops. NRC Research Press, Ottawa, Ontario, Canada, 108-115.
- Wilhelm, L.R. 1990 Ginseng drying - the effect of drying air temperature and humidity upon quality. Transactions of the American Society of agricultural engineers, vol 6(5), 635-639.
- Wills, R.B.H. and Stuart, D.L. 2001 Production of high quality Australien ginseng. A report for the Rural industries research and development corporation (RIRDC publication No 01/170.
- Ying, Z., Xiuquan, W. YuanChun, F. 2002 Study on deoxidizer used during the storage of commercial ginseng. Journal of Jilin Agricultural University, 24(4), 73-75. (Abstract).

Konklusion og strategioplæg

Konklusion og forslag til strategiske indsatser på ginseng i Danmark

Konklusion (Resume)

Overordnet set har projektet dels givet en række konkrete resultater i form af ny viden eller ny sammenstilling af viden, dels øget partnernes samlede kompetencer indenfor bl.a. forskning, produktudvikling og markedsføring. Herudover har projektet også medvirket til øget bevidsthed om andre interessenter og deres kompetencer, og sat fokus på værdien af 'at netværke' med interessenter i og uden for projektet. Herved er der skabt basis for målrettede fremtidige samarbejder og udnyttelse af synergier mellem forskellige ginseng interessenter. Projektet har herudover identificeret nogle særlige områder, hvor potentialet for videre forskning og udvikling, herunder erhvervs- og produktudvikling vurderes at være stort.

I det følgende omtales de vigtigste områder, hvor det vurderes, at der er et stort potentiale og hvor en ekstra indsats på ginseng, vil kunne betyde stærkt forbedrede muligheder for dels udnyttelse i erhvervet og dels udnyttelse af de forebyggende eller sygdoms-bekæmpende egenskaber hos ginseng i borgersundheden. Disse områder vil være centrale i et strategisk videre arbejde på ginseng i Danmark.

Resultaterne af både det kliniske og det prækliniske review viste, at der er voksende dokumentation for og interesse for centrale sundhedsmæssige effekter af ginseng produkter. Her skal især nævnes tre effekthovedområder, som ser særligt lovende ud og samtidig udgør stigende eller udbredte problemer i samfundet.

- Diabetes II - forebyggelse eller sygdomsbehandling
- Anticancer effekt – forebyggelse eller bekæmpelse
- Immunforsvarsstimulering – forebygge eller bekæmpe virus, lungebetændelse mv.

Lovende effekter er set i både ekstrakter af ginseng bær, rødder og isolerede enkeltstoffer i flere ginseng arter, og der begynder at dukke specifikke produkter op på markedet i enkelte lande.

I projektets forsøg med testning af ekstrakter og enkeltstoffer i cellebioassay, viste der sig også lovende effekt i relation til diabetes II og uden fedmeskabende bivirkninger. Danmark har generelt store forskningskompetencer på diabetes området (især SDU) og dette bør give mulighed for en fremtidig udvikling af såvel samfundsgavnlig viden som forebyggende eller bekæmpende produkter baseret på ginseng. Tilsvarende har Danmark stor ekspertise på immunforsvarsforskning på Rigshospitalet, hvilket også giver basis for øget forskning og udvikling. Endeligt leder verden til stadighed efter bedre og mere effektiv anticancer produkter og muligheder for, at udvikle eksperimentel viden og teste ginseng produkter i Danmark er afgjort til stede.

Der er behov for yderligere klinisk/præklinisk forskning i effekter. Dette skal dog ske i tæt samarbejde med biokemikere og farmaceuter, der kan isolere, identificere og kvantificere indholdet i de testede prøver meget præcist. Herved undgås de svagheder, der er set i tidligere internationale kliniske forsøg pga. stærkt varierende og ikke altid nærmere

defineret indhold i test præparater. Finansieringsmæssigt og udnyttelsesmæssigt bør denne udvikling kunne ske i samarbejde med større medicinal eller kosttilskudsfirmaer. Samfundet får først udnyttet ny viden når det er omsat til tilgængelige dokumenterede produkter.

Et tæt netværk og øget interaktion mellem farmaceutiske firmaer og forskning i biokemi, bioassay testning og klinisk forskning kan bane vejen frem mod fremtidens produkter. Da både forebyggende og behandlende medicinske produkter er efterspurgt bør der være markedsmuligheder for både kosttilskud, plantelægemidler og decideret medicin i fremtiden.

Erhvervet bør gå i tættere samarbejde med den offentlige forskning og udpege tydeligere hvilken forskning, der kan bidrage til at videns- og dokumentationsniveauet løftes til et stadie, hvor det bliver interessant for firmaerne investerings- og udviklingsmæssigt, at tage over. Et forbedret samarbejde mellem offentlig forskning og erhverv bør kunne bringe vidensniveauet på flere områder med særligt potentiale op over den kritiske tærskel for erhvervsinteresse.

Et mere bevidst forskningssamarbejde både nationalt og internationalt bør tilsvarende kunne øge kompetencer til, at sikre et effektivt flow i en målrettet videnproduktion.

Kompetencerne indenfor både forskning, udvikling og rådgivning vil kunne danne baggrund for 'salg af ekspertise' generelt ikke kun relateret til ginseng. Dette er allerede en realitet i TCMDenmark konsortiet.

Udover de tunge potentialer på sundheds og sygdomsområdet skal, der knyttes nogle kommentarer til nogle supplerende områder.

Dansk teknologi og vidensniveau indenfor ekstraktion og separation af biologiske komponenter er af høj standard. Som på al plantemedicin er disse processer kritiske for, at opnå kost-effektive processer og meget rene produkter. I ginseng forskes der både nationalt og internationalt, en del på effekten af særlige ekstraktfraktioner eller isolerede rene stoffer. Det anses for sandsynlig, at der i fremtiden vil blive endnu større fokus på disse rene stoffer eller blandinger af disse. Der er derfor et potentiale i, at udvikle avanceret procesteknologi til, at sikre disse produkter. Tilsvarende er der et behov for, at kunne optimere stofudbytter via bevidst modificering af de oftest mange afledede derivater af aktivstoffer. Her vil udvikling af såvel kemisk/biokemisk modificering samt enzymatisk modificering kunne blive vigtige fremtidige teknikker. De første undersøgelser på enzymatisk modificering af ginseng mod højere kvalitet af præparater er publiceret for nylig i Korea. Dansk know how på enzymer er verdenskendt og et bevidst samarbejde om udvikling af metoder vil have et ikke uvæsentligt potentiale på verdensmarkedet. Vidensområdet vil have værdi bredt i plantemedicinområdet men også kunne tilføre ny principiel viden i relation til fødevareteknologi

En satsning på området kan dels medføre salg af teknologisk viden/avanceret apparatur, dels potentielt skabe mulighed for produktion og salg af nye stærkt forædlede produkter. Skabes der god sammenhæng mellem dokumentationen af aktivstoffers virkning og den teknologiske udvikling vil synergieffekter kunne bevares på danske hænder.

På dyrkningsområdet kan man skelne mellem produktion af råvarer til kosttilskud/ plantemedicin/ forarbejdning mv. eller produktion af prydplanter /viderekultursplanter til nonfood.

En generel produktion af råvarer i Danmark vil have svært ved at konkurrere med de internationale priser. En dansk råvare produktion kræver derfor dels, at der dyrkes en helt unik kvalitet eller unikt produkt, dels at producenten også tager del i slutforarbejdning af produktet frem til salg og dermed kan styre og få del i avancer frem til forbrugerne (in farm processer). I særlige tilfælde kan man måske via tæt samarbejde mellem avlere og farmaceutiske firmaer opnå en konkurrencedygtig 'off farm proces'. (se vedlagte uddybende bilag fra FEC vedr. 'ægget og hønen' problematik).

Projektet har vist, at der er dyrkningsvanskeligheder men også et markedspotentiale i ginseng som potteplante eller udplantningsplante til videre dyrkning hos forbrugere. Kombinationen af en attraktiv prydsværdi, en unik anvendelses historie samt potentielt muligheden for, at spise roden efter prydsværdien er aftaget giver interesse på både det nationale og internationale marked. Hvor et potteplanteprodukt måske vil udgøre en begrænset trend på markedet, vil udplantningsplanter til private potentielt kunne have en blivende markedsinteresse som 'dyrk selv ginseng', altså en erstatning for de piller som omsættes i stor stil.

I forbindelse med plantematerialet er der et vist potentiale i, at foretage forædling mod særlige mål både i relation til indholdsstoffer, men også på dyrkningsegenskaber, f.eks. udbytte og sygdomsresistensegenskaber. Projektet har vist grundlæggende gode muligheder for en væsentligt udbytte forøgelse. Forædlede planter kan nyhedsbeskyttes og dermed give licensindtægter ved salg af formeringsrettigheder til avlere i såvel Nordamerika og Asien.

Af de ovenstående potentialer er sygdoms og sundhedsområdet så langt det vigtigste område og det anbefales derfor, at samarbejdet mellem den danske forskningsekspertise på de nævnte sygdomsområder øges og sikres sammenhæng med de farmaceutiske erhvervs udviklingsmuligheder på området.

Strategiske samarbejder mellem råvareproduktion og aftagerfirmaer
Palle Møldrup, Fyns ErhvervsCenter

I en undersøgelse af afsætningsmulighederne for dansk producerede medicinplanter har Fyns ErhvervsCenter skabt kontakt til en række danske virksomheder med hovedvægten på virksomheder inden for helsekost- og medicinalbranchen i Danmark.

Hønen eller ægget

Der er én problemstilling, som er gået igen i hele forløbet. Virksomhederne er generelt positive overfor muligheden for, at anvende danske urter i deres produkter, men når det er sagt, kommer de næste uundgåelige spørgsmål: Hvad koster urterne? Og hvor store kvantum, kan de leveres i? Disse spørgsmål er imidlertid ikke så lette, at besvare indenfor et nyt område som dyrkning af lægeplanter, der endnu ikke er nået til storproduktion. Virksomhederne vil have pris og mængde fastlagt og leveringssikkerhed, inden de afgiver ordre, og dyrkerne vil ikke opskalere deres produktion, inden de har en underskrevet aftale om afsætning af planterne. Dette afspejler den berømte situation om hønen eller ægget?

Leveringssikkerhed

Mange medicinplanteavlere i Danmark har vanskeligheder med, at finde afsætning for deres produktion af plantemateriale til helsekost- og medicinalbranchen. En af grundene hertil er en for lille dyrket mængde af hver planteart. Færdigvareproducenterne af kosttilskud og naturmedicin tør således ikke binde an på køb af danskproduceret plantemateriale så længe dyrkningen ikke er opskalaret, da de er usikre på, om der i fremtiden kan sikres en vedvarende levering i den rette kvalitet og til en konkurrencedygtig pris.

Besværligt leverandørskifte

En anden parameter, som er med til at holde udviklingen af danskproducerede medicinplanter tilbage, er det besværlige leverandørskifte, som er en realitet, når der er tale om naturmedicinproduktion. Naturlægemidler og traditionelle plantelægemidler skal godkendes hos Lægemiddelstyrelsen, og et led i denne godkendelse er en registrering af råvareleverandøren. Det vil sige, at man ikke bare lige skifter en råvareleverandør ud, da man så skal have en ny markedsføringstilladelse hos Lægemiddelstyrelsen.

Plantedyrkeren

Set fra plantedyrkerens side er det risikofyldt, at opskalere planteproduktionen før der er indgået aftale om afsætning. Plantedyrkeren risikerer nemlig, at sidde tilbage med en hel produktion af plantemateriale, som ikke kan afsættes. Der bruges mange ressourcer på en sådan produktion i form af afgrøder, arbejdstimer, m.m., som dyrkeren derved ikke opnår indtjening for. Nogle danske dyrkere har allerede været i den situation, at de har satset på en medicinplanteproduktion, som de ikke har fundet afsætning for efter høst.

Strategiske samarbejder

En løsning på problemet kan være et strategisk samarbejde mellem en virksomhed og en eller flere dyrkere om levering af en given mængde af en bestemt urt til en bestemt pris på et bestemt tidspunkt. I et strategisk samarbejde udarbejdes en kontrakt mellem virksomhed og dyrker således, at dyrkeren binder sig til, at levere et bestemt produkt og virksomheden binder sig til, at købe produktet. Dyrkeren har således sikkerhed for afsæt af sine afgrøder og kan opskalere sin produktion uden de store risici.

Fordele ved Dansk produktion af lægeplanter

Men hvilket incitament har virksomheden til, at indgå i et sådant strategisk samarbejde? Der er flere grunde til, at anvende danskproducerede urter. Dansk landbrug tilbyder nemlig dyrkning af udvalgte og veldokumenterede medicinplanter. Planterne dyrkes efter dyrkningsmetoder, der optimerer planternes indhold af aktivstoffer, og som efterfølgende forarbejdes efter en skånsom metode tilpasset hver enkelt plante, som sikrer bibeholdelsen af de virksomme aktivstoffer i plantematerialet. Desuden dokumenteres planternes renhed i forhold til svamp, pesticidrester mm, samt plantematerialets holdbarhed. Der sikres således en optimal behandling af urterne hele vejen i processen fra marken til færdigt produkt. Det vil sige, at urten høstes, tørres, forarbejdes og ekstraheres på en måde, der sikrer det højeste mulige indhold af aktive indholdsstoffer i slutproduktet. Desuden er, der sporbarhed på planterne helt tilbage til marken, hvorpå de er dyrket. En virksomhed vil således kunne oplyse sine forbrugere om, præcis hvor urterne i et produkt er dyrket, og virksomheden vil også selv have mere kontrol med sine råvarer, hvilket der stilles større og større krav om i dag.

Et voksende marked

En større og større del af befolkningen anvender i dag alternative behandlingsformer blandt andet i form af urtebaserede helsekostprodukter. WHO estimerede i 2003 det globale marked for plantemedicin til 60 mia. USD – et marked som er i kraftig vækst. Så der er god grund til at være optimistisk for den spirende medicinplanteindustri i Danmark.

Andre brancher

Der er også andre brancher, som kan have glæde af anvendelsen af urter i deres produkter. Mange af urterne har jo ikke blot en helsebringende effekt på mennesker, men kan også tilføre andre egenskaber til for eksempel fødevare- og ingrediensindustrien.

Forudsætninger

Men for, at det kan lykkes skal der være en større risikovillighed hos begge parter både virksomheden, der er den potentielle aftager af plantematerialet og hos dyrkeren /erne. Virksomheden skal kunne se de førømtalte fordele og se muligheden for, at udnytte de særlige fordele, der kan være forbundet med et høj kvalitetsprodukt.

Dertil kommer, at virksomheden skal se det som et udviklingsprojekt, at opnå disse fordele og dermed have en interessehorisont der muliggør, at en lille forsøgsproduktion kan blive skaleret op til en effektiv produktion.

Mange landmænd og gartnere er villige til, at prøve nye afgrøder, men skal samtidig kunne se en fordel på længere sigt. Derfor skal parterne arbejde tættere sammen og blive enige om en udviklings- og forretningsplan for et fælles produkt. Dette anbefaler vi både dyrkere og færdigvarevirksomheder og rådgiver gerne i dette arbejde.

Liste over publikationer fra projektet

Int. Videnskabelige artikler under forberedelse (foreløbige titler)

Christensen, L. P., Kidmose, U. & Jensen, M. (2006). Simultaneous determination of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng root (*Panax quinquefolium* L.) by high performance liquid chromatography. ***Journal of Agricultural & Food Chemistry***. (er accepteret aug. '06)

Christensen, L. P. & Jensen, M. (2006). Effect of root size on the content of ginsenosides and polyacetylenes of 6 year old American ginseng roots. ***Journal of Agricultural & Food Chemistry***, in preparation.

Jensen, M. and Christensen, L.P. (2006) Understanding variation in yield and composition of bioactive contents of American ginseng as a basis for selection of superior planting stock.

Jensen, M. and Christensen, L.P. (2006) Variation, yield components and content of bioactive compounds in berries of American ginseng.

Kristiansen, K., Christensen, L.P. and Jensen, M. (2006): Effects of pure single ginsenosides and extracts of root and berries of American ginseng on performance in a multiple test diabetes bioassay.

Bidstrup, T. and Brøsen, K. (Review som kort int. videnskabelig artikel)

Bidstrup, T., Brøsen, K., Jensen, M., Christensen, L.P. og Kristiansen, K. (2006) Review of recent reported clinical effects of ginseng. DIAS report Horticulture no. 32, January 2006.

Artikler med projektpartner involvering - planlagte eller bragte i 1. kvartal 2006.

Steensig, S. L. (2006). Der er ingen penge i ginseng. Landbrugsavisen 6. januar 2006, s 19 (økonomi) (Interview med Jens Højlund Olsen om ginseng).

Jensen, M. (2006) Dyrk din egen ginseng. Havebladet (Kolonihaveforbundets blad), 1, 20-21, artikel accepteret primo januar 06.

Jensen, M. (2006) Ginseng - godt på vej. I Udviklingscenter Årsløvs projektavis, 3, s. 17.

Jensen, M., Christensen, L.P. and Kristiansen, K. (2005). Danish cooperation and research in plant medicine. Nyhedsbrevet Danmarks JordbrugsForskning, september 2005.

Jørgensen, A. & Jensen, M. (2005). Bredt samarbejde om ginseng. Projektavis "Planter til sundhed" 2, 14-15.

Jensen, M. (2005). Ginseng i Danmark - hvor skal vi hen? Gartner Tidende 121(11), 12-13.

Jepsen, M. (2005). Ginseng en plante med muligheder. Gartner Tidende, 22: s 10.
(interview med Kongshave Ginseng)

Ginseng projektet var repræsenteret ved Forskningens døgn i Odense d 12. maj 05 og ved kulturnatten i Fødevareministeriet i oktober. Derudover nævnt og vist i en række tv spots på Fyn lokalt.

Ginseng området nævnt i Hvidbog fra Ugebrevet Mandag Morgen.

Jensen, M. (2005). Ginseng. Præsentation for Odense Højskolekreds, DJF Årslev den 9. november 2005.

Kongshave Ginseng indlæg til Udviklingscenter Årslev projektavis 06.

Abstracts ved internationale konferencer

Christensen, L. P., Jensen, M. & Kidmose, U. (2006). Simultaneous determination of ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng (***Panax quinquefolium*** L.) using high-performance liquid chromatography. Poster abstract at the 54th Annual Congress on Medicinal Plant Research, Helsinki, 29. August–2. September 2006, Helsinki, Finland. ***Planta Medica*** 72, 1074.

Christensen, L. P. & Jensen, M. (2006). Effect of root size on the content of bioactive ginsenosides and polyacetylenes of 6-year old American ginseng (***Panax quinquefolium*** L.) plants. Poster abstract vil blive indsendt til konferencen ***Highlights of the Phytochemical Society of Europe***, Churchill College, Cambridge, UK, 11.–14. April 2007.

Christensen, L. P., Jensen, M. & Kidmose, U. (2006). HPLC-DAD method for simultaneous determination of neutral and acidic malonyl-ginsenosides and polyacetylenes in American ginseng (***Panax quinquefolium*** L.) roots. Poster abstract indsendes til konferencen ***Highlights of the Phytochemical Society of Europe***, Churchill College, Cambridge, UK, 11.–14. April 2007.

Mundtlig – formidling i projektet.

Ginseng workshop i juni 05 - mange indlæg vedr. ginseng forskning, erhverv, lovgivning, afsætning mv. Alle præsentationer på hjemmeside www.UCAA.dk/ginseng

Ved TCM Denmark konferencen i Odense i oktober 2005 blev der givet 4 foredrag, der vedrørte aspekter af ginseng, herunder 3 foredrag over projektets resultater. Alle præsentationer på hjemmesiden www.Tcmdenmark.dk.

Jensen, M. & Christensen, L.P. (2005). Variation in growth rate and bioactive compounds in american ginseng - a basis for improving plant material. Lecture presented at The TCM at the Crossroads between China and Europe, Congress on Traditional Complementary Medicine, 16-19 October 2005, Odense, Denmark.

Jensen, M. (2005). Modernisation of seed storage, pre-treatment and germination of American ginseng seeds. Lecture presented at The TCM at the Crossroads between China and Europe, Congress on Traditional Complementary Medicine, 16-19 October 2005, Odense, Denmark.

Foredrag i 2006 vedr. ginseng:

Jensen, M. (2005). Medicinal planten Ginseng. Præsentation for Kolonihaveforbundets konsulenter, Odense, den 23. september 2005.

Christensen, L.P. og Jensen, M. (2006). Ginseng – forbedret udbytte og råvarekvalitet: produktmuligheder og afsætning. Fælles foredrag ved seminar den 7. februar 2006 DJF Årsløv 'Fra forskningside til ny produktion'.

Liste over projektdeltagere

Martin Jensen	Seniorforsker	Danmarks JordbrugsForskning	Kirstinebjergvej 10	5792	Årsløv	89 99 33 86	martin.jensen@agrsci.dk
Lars P. Christensen	Adjung. Prof.	Danmarks JordbrugsForskning	Kirstinebjergvej 10	5792	Årsløv	89 99 33 67	Larsp.christensen@agrsci.dk
Karsten Kristiansen	Professor	Syddansk Universitet	Campusvej 55	5230	Odense M	65 50 24 08	kak@bmb.sdu.dk
Kim Brøsen	Professor	Odense Universitets Hospital	Winsløwparken 19, 3. sal	5000	Odense C	65 50 37 51	kbrosen@health.sdu.dk
Morten Kobæk-Larsen	Forsker	Syddansk Universitet, Biomed.lab.	Winsløvparken 23	5000	Odense C	65503722	mkobaek@health.sdu.dk
Jannick Nøddekær	Lektor	Ingeniørhøjskolen Odense Teknikum	Niels Bohrs Allé 1	5230	Odense M	63 14 04 79	jn@iot.dk
Palle Møldrup	Afdelingschef	Fyns ErhvervsCenter	Forskerparken 10C	5230	Odense M	70 21 18 50	pm@fec.dk
Marianne Jepsen	Hortonom/konsulent	Dansk Erhvervsgartnerforening	Hvidkærvej 29	5250	Odense SV	63 17 51 52	mj@deg.dk
Poul Madsen	Cand. Scient	Grønt Center	Maribovej 9	4960	Holeby	54 60 70 00	phm@greencenter.dk
Kirsten Milert	Fabrikschef	Dansk Droge	Industrigrenen 10	2635	Ishøj	43 56 56 56	km@danskdroge.dk
Jens Højlund	Ejer	Højlands Ginseng	Dåstrup Hulvej 2	4130	Viby Sj.	21 64 37 05/ 46 19 37 05	hojlunds@hojlunds.dk
Ole Have Rasmussen	Ejer	Kongshave Ginseng	Stenlandsvej 7	4000	Roskilde	35 85 03 07/ 46 75 54 57	kongshave@mail.dk
Martin Jørgensen	Ejer	Biosynergy	Østerhovedvej 4, Skarø	5700	Svendborg	62 20 12 01	mej@biosynergy.dk
Torben Madsen	Ejer	VIKOS	Mellemhaven 36, Hågerup	5600	Fåborg	62 65 12 60/ 22 15 44 62	vikos@vikos.dk
Lars Rosborg	Ejer	Gartneriet Rosborg	Brændekildevej 43	5250	Odense SV	63 96 33 00	
Poul Timmermann	Ejer	Gartneriet Timmermann	Skovgyden 10	5450	Otterup	64 82 19 38	poul@timmermann.dk
Palle Fabricius	Ejer		Gartnervænget 14	5240	Odense NØ	66 10 17 02	